

IMMUNCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN CARBOXYLESTERASEN

Peter Kurt Hain

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Zentrum für Biochemie
der Justus Liebig-Universität Gießen

IMMUNCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN CARBOXYLESTERASEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des
Bereichs Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität
Gießen



vorgelegt von
Peter Kurt Hain
aus Litzmannstadt
Gießen 1973

Dekan:	Prof. Dr. Hj. Staudinger
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. K. Krisch
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gundlach
2. Berichterstatter:	Doz. Dr. J. Krüger

Gesamtherstellung:



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN · AM KAPPELCHEN 1
TELEFON 0 61 32 - 5711



Wahlzettel

Seite 1

Kandidaten

Parteien

1. CDU/CSU

2. SPD

3. Bündnis 90/Die Grünen

4. FDP

5. Linke

6. Die Basis

7. PDS

8. Die Partei

9. Die AfD

10. Die Partei für Arbeit, Wohlstand und Freiheit

11. Die Partei

12. Die Partei

13. Die Partei

14. Die Partei

15. Die Partei

16. Die Partei

17. Die Partei

18. Die Partei

19. Die Partei

20. Die Partei

21. Die Partei

22. Die Partei

23. Die Partei

24. Die Partei

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG	1
METHODIK	2
A Gewinnung von Antisera	2
1. Immunisierung	2
a) Herstellen der Immunisierungslösungen	2
b) Injektion	2
c) Blutentnahme	3
d) Lyophilisieren	3
B Titerbestimmungen durch Äquivalenzpunkt-Titration	3
C Diffusionsteste	5
1. OUCHTERLONY-Teste	5
2. Antikörper-Absorptionsteste	6
3. Immunelektrophorese zur Klassifizierung der Antikörper	6
D Immunelektrophorese	7
1. Reagenzien	7
2. Agargel-Mikroplatten	7
3. Ausführung der Elektrophorese	8
E Nachbehandlung und Färbung der Präparate	9
1. Waschen	9
2. Trocknen	9
3. Färben	10
F Dokumentation des Präzipitationsbildes durch Fotografie	11
G Quantitative Präzipitationsversuche	11
1. Vorversuche	12
2. Präzipitationsversuche mit ansteigenden Antigenmengen	12
3. Bestimmung der Enzymaktivitäten	12
4. Bestimmung des Proteingehaltes in den Immunpräzipitaten	14

H	Titration der aktiven Zentren von Esterasen mit E 600 bzw. BNPP	15
ERGEBNISSE		17
I.	Prüfung der Enzympräparationen auf Einheitlichkeit	17
1.	Vergleichende radiale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY und radiale lineare Doppeldiffusion	17
	a) Prüfung der Reinheit von Schweineleberesterase mit Hilfe der radialen-linearen Doppeldiffusion	17
	b) Prüfung der Reinheit von Schweinenierenesterase	19
	c) Artefakte bei langen Diffusionszeiten und beim Arbeiten in Bereichen außerhalb des Enzym-Äquivalenzbereiches	19
2.	Immunelektrophorese	20
II.	Untersuchungen zur Frage der immunologischen Identität bzw. Verwandtschaft	21
III.	Quantitative Immunpräzipitationskurven	22
IV.	Zur Stöchiometrie des AG-AK-Komplexes	24
V.	Versuche zur Frage der Beziehungen zwischen Antikörperbindung und aktivem Zentrum von Carboxylesterasen	26
1.	natives Enzym	26
2.	phosphorylierte Enzymderivate	27
3.	Einfluß von Photooxydation, Dodecylsulfat und Hitze-denaturierung	27
DISKUSSION		28
ZUSAMMENFASSUNG		35
LITERATURVERZEICHNIS		36
ANHANG = Abbildungen und Tabelle		

EINLEITUNG

In den vergangenen Jahren haben KRISCH et al. hochgereinigte Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) aus Schweineleber (22, 23), Schweineniere (11, 12) und Rinderleber (4) isoliert. Die drei Präparationen stimmen in vielen Eigenschaften überein (Verhalten bei Säulenchromatographie, Ammoniumsulfatfällung, Molekulargewicht, Zahl der aktiven Zentren, pH-Optimum u.a.). Andererseits wurden einige Unterschiede beobachtet, z.B. in den Wechselzahlen gegen verschiedene Substrate, im Verhalten gegen einige Inhibitoren und in der Stabilität bei niedrigen pH-Werten.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, inwieweit die drei Enzymproteine identisch sind. Zur Klärung dieses Problems bieten sich neben Methoden der Proteinchemie immunologische Verfahren an. In der vorliegenden Arbeit wird über einige Ergebnisse zur immunologischen Reinheit und Verwandtschaft von Carboxylesterasen verschiedener Herkunft berichtet.

METHODIK

A Gewinnung von Antiseren

1. Immunisierung:

Schweineleber-, Schweinenieren- bzw. Rinderleberenzym wurden Kaninchen zusammen mit komplettem FREUNDschen Adjuvans injiziert. Die Lösungen enthielten in der Regel 1 mg Enzym in 1 ml.

a) Herstellen der Immunisierungslösungen: Konzentrierte Enzymlösungen mit einem Gehalt von 5 mg Enzym werden mit 0,9% NaCl auf ein Volumen von 2,5 ml gebracht und mit dem gleichen Volumen an Adjuvans innig vermischt. Dazu wird das Gemisch von Enzym und 0,9% NaCl in einer 5 ml Injektionsspritze (Inaltera Supra) aufgezogen. In einer anderen Spritze finden sich die 2,5 ml des FREUNDschen Adjuvans. Beide Spritzen werden über ein ca. 5 cm langes Röhrchen von 2 mm Durchmesser mit angeschweißten Bajonettanschlüssen festschließend miteinander verbunden. In der Mitte dieses Zwischenstückes findet sich eine ca. 0,02 mm große Düse. Nach mehrmaligem, kräftigen Mischen entsteht eine weißliche, zähflüssige Emulsion, die zunehmend konsistenter wird. Dabei nimmt der Spritzwiderstand zu. Jetzt wird maschinell weitergemischt, bis die Emulsion ausreichend steif ist. Dies ist sie, wenn ein auf Wasser gefallener Tropfen nicht mehr zerfließt.

b) Injektion: Es wurden etwa 8 Injektionen von je 0,4 bis 0,5 mg Enzymprotein in Abständen von einer Woche durchgeführt. Die beiden ersten Injektionen erfolgten nach Rasur des Felles intracutan auf vier bis fünf Stellen verteilt; die späteren subcutan und einmal intravenös (in diesem Fall ohne Adjuvans).

14 Tage nach der letzten Injektion wurde erneut 1 mg Enzymprotein injiziert ("Boosterung") und nach weiteren 6-10 Tagen Blut aus der Ohrvene entnommen.

c) Blutentnahme: Kleinere Blutmengen, z.B. für Titerverlaufskontrollen, wurden nach folgendem Verfahren entnommen: Das Kaninchen sitzt eng in einem Kasten, aus dem nur der Kopf herausragt. Mit der Schere wird das Fell im Bereich einer Ohrvene entfernt, die freie Stelle mit Xylol abgerieben und die Vene mit einer 14er Kanüle von proximal punktiert.

Es lassen sich so leicht 10 bis 20 ml Blut entnehmen. Sollten größere Mengen entnommen werden, hat sich bei uns auch folgendes Verfahren bewährt: Das Kaninchen wird mit einer i.v. Injektion einer 4% Na-Evipanlösung (30 bis 50 mg/kg Körpergewicht) in die Ohrvene narkotisiert. In einem Bezirk der Ohrvene wird das Fell entfernt und das Gefäß mit einer Rasierklinge angeschnitten. Dann wird eine langausgezogene Glasglocke über das Ohr gestülpt (Firma Vogel, Gießen) in der über einen Schlauchanschluß und eine Vakuumpumpe ein mehr oder weniger starkes Vakuum erzeugt werden kann. Mit zunehmendem Unterdruck spritzt das Blut aus der Vene und fließt in den Handgriff der Glocke oder in ein luftdicht angeschlossenes Gefäß, z.B. ein Servall Zentrifugenröhrchen. Es lassen sich so problemlos bis 100 ml Blut entnehmen, was von größeren Kaninchen meist gut vertragen wird. Die überlebenden Kaninchen wurden wiederholt geboostert.

d) Lyophilisieren: Die Zentrifugenröhrchen mit ca. 30 ml Blut werden für etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 15 min. zentrifugiert (10 000 Umdrehungen pro Minute). Dann kann das Serum dekantiert werden. Anschließend wird es in einer präparativen Ultrazentrifuge (SPINCO; Fa. Beckman) 30 min. lang bei 100 000 g zentrifugiert (15). Danach wird das Serum in einem großen Kolben mit Hilfe eines Kyrastaten eingefroren und dann gefriergetrocknet. Das bei 0° C aufbewahrte Lyophilisat ist über Jahre beständig. Das verwendete Antiserum wird erhalten, wenn 100 mg Lyophilisat in 1 ml Wasser gelöst werden.

B Titerbestimmungen durch Äquivalenzpunkt-Titration (20)

Titerbestimmungen wurden im Verlauf der Immunisierung notwendig, um den Anstieg der Antikörper im Serum nachzuweisen. Wir bestimmten den Antikörpergehalt durch Titration der Antikörper mit Antigen im Präzipitationstest und erhielten den Äqui-

valenzpunkt als Maximum der Präzipitationskurve bei verschiedenen hohen Antigenkonzentrationen. Die Bestimmung erfolgte nephelometrisch (ZEISS Spektralphotometer; E_{450} ; $d = 0,5 \text{ cm}$; siehe Seite 12).

Ausführung:

Zu 0,1 ml Antiserum gaben wir in einem Reihenversuch steigende Mengen Schweineleberesterase (Proteingehalt 1 mg/ml) in "Mikrofugenröhrchen" (Mikrolitersystem "EPPENDORF", Fa. Netheler u. Hinz, Hamburg). Nach Durchmischung und einer Stunde Inkubation bei 37°C , anfänglich noch nach weiteren 12 Stunden in der Kühlzelle bei ca. 4°C , wurde der Ansatz mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Der Antigenwert, dem der maximale Trübungswert zuzuordnen war, diente zur Angabe des Titors.

Schnellausführung:

Für orientierende Untersuchungen beschränkten wir uns auf die Ausführung in vereinfachter Form. Dabei wurde nur der Trübungswert für 0,1 ml Serum plus 0,02 ml der Enzymlösung vom Proteingehalt 1 mg/ml bestimmt. Dieses Verfahren ist solange zulässig, wie sich im Doppeldiffusionstest keine Antikörper nach Zentrifugation im Überstand nachweisen lassen.

Beispiel:

Titeranstieg eines vor einem Jahr immunisierten Tieres nach Boosterung mit i.v. Gaben von Schweineleberesterase insgesamt 4,25 mg über 20 Tage in ansteigender Dosierung (Abb. 1).

C Diffusionsteste

1. Ouchterlony-Teste

Die Geldiffusionsteste nach OUCHTERLONY (31) wurden entweder in Petrischalen mit rosettenförmiger Anordnung der Stanzlöcher oder in der Mikrotechnik auf Objektträgern durchgeführt. Als Konservierungsmittel setzten wir dem Gel 0,1% Merthiolat ¹⁾ (Eli Lilly GmbH, Gießen) zu. Wir folgten bis auf die Änderung des Konservierungsmittels weitgehend der Arbeitsvorschrift in l.c. (44). Alle Versuche wurden mit 1% Reinagar der Behringwerke durchgeführt (Behringwerke, Marburg/Lahn).

Ausführung:

Ein Gemisch von 1 g Reinagar, 25 ml 0,15 m Phosphatpuffer pH 7,1, 75 ml dest. Wasser und 1 ml 1% Merthiolat-Lösung wird in einem Erlenmeyer-Kolben erhitzt, bis die Trübung des Agars verschwunden ist. In große Petrischalen von 8 cm Durchmesser werden 22 ml der heißen Lösung gegeben, in die kleineren mit 6 cm Durchmesser 12 ml und auf Objektträger 3 ml. Die Schalen und Objektträger liegen auf einer ebenen, waagrecht eingerichteten Platte. Nach Erkalten können die Gel-Präparate in die feuchte Kammer gestellt werden.

1) Abkürzungen:

AS-Schweineleberenzym = Antiserum vom Kaninchen gegen Schweineleberesterase
(sinngemäß für andere Enzyme).

E 600 = Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat

Merthiolat = Na-Äthylmercurithiosalicylat

BNPP = Bis (p-Nitrophenyl) phosphat

AK = Antikörper

AG = Antigen

2. Antikörper-Absorptionsteste

Ein Objektträger wurde mit Agar überschichtet. Nach Erkalten der Agarschicht wurden zwei parallele Gräben ausgehoben und drei runde Löcher so gestanzt, daß sie zu beiden Gräben den gleichen Abstand hatten (entsprechend der in Abb. 2 dargestellten Versuchsanordnung). In den oberen Graben wurde zum Vergleich AS-Schweineleberenzym beschickt, das mit einem Überschuß an Schweineleber-, Schweinenieren- oder Rinderleberenzym eine Stunde bei 37° C vorinkubiert worden war.

Ausführung:

0,2 ml AS-Schweineleberesterase werden in Mikrozentrifugenröhrchen (Mikroliter-system "EPPENDORF") mit 0,04 ml einer Enzymlösung von ca. 1 mg/ml innig durchmischt. Die Ansätze werden eine Stunde bei 37° C inkubiert. Danach bleiben sie 12 Stunden in der Kühlzelle, werden in der Mikrofuge zentrifugiert und die Überstände im radialen-linearen Doppeldiffusionstest eingesetzt.

3. Immunelektrophorese zur Klassifizierung der Antikörper

Die gleiche Anordnung wie beim Absorptionsversuch mit nur einem runden Stanzloch zwischen den Gräben wurde bei einem immunelektrophoretischen Versuch eingesetzt, der klären sollte, zu welcher Globulinfraktion die Antikörper gegen Schweineleberesterase gehören.

Ausführung:

In den oberen Graben werden 0,1 ml Eselantiserum gegen Kaninchenserum gefüllt, in den unteren 0,1 ml einer verdünnten Lösung von Schweineleberesterase mit einer Proteinkonzentration von 0,12 mg/ml. In das runde Stanzloch zwischen den Gräben werden in verschiedenen Präparaten ansteigende Konzentrationen von AS-Schweineleberesterase gegeben. Aus der Lage der Bande gegen den unteren Graben im Vergleich zu denen gegen den oberen Graben kann die Einteilung der Antikörper gegen Schweineleberesterase erfolgen.

Die Konzentrierung von AS-Schweineleberesterase bis ca. auf das Zehnfache ist notwendig, da sonst von seiten der Schweineleberesterase starker Antigenüberschuß besteht. Eine Versuchsanordnung ist in Abb. 3 gezeigt.

D Immunelektrophorese

Die Untersuchungen wurden mit der Mikromethode von SCHEIDEGGER (41) nach den Angaben von GUNDLACH (14) durchgeführt. Wir verwendeten die Apparaturen der Firma LKB (Stockholm/Schweden) und den Immunelektrophoresezusatz zur Elektrophoreseapparatur der Firma Boskamp.

1. Reagenzien:

Vom Barbituratpuffer nach MICHAELIS wird zunächst eine Stammlösung mit einer Ionenstärke μ von 0,15 hergestellt. 33,8 g Natriumdiäthylbarbiturat und 88,3 g Natriumacetattrihydrat werden in 10 l aqua dest. gelöst. Mit 0,1 n HCl stellt man auf pH 8,2 ein.

Den Elektrodenpuffer von $\mu = 0,1$ und den Gelpuffer von $\mu = 0,05$ erhält man durch entsprechende Verdünnung.

2. Agargel-Mikroplatten:

1 g Reinagar (Behringwerke, Marburg/Lahn) wird mit 100 ml Gelpuffer gemischt und im Erlenmeyerkolben bis zur Bildung einer klaren Lösung auf heißer Flamme erhitzt. Zur Konservierung werden in die heiße Lösung noch 1 ml 1% Merthiolat gegeben. Um ein vorzeitiges Erstarren des Gels zu verhindern, stellt man den Erlenmeyerkolben zum Gießen der Plättchen ins heiße Wasserbad von ca. 80° C.

Die Objektträger sind in 80% Äthanol aufbewahrt. Sie werden vor Gebrauch sorgfältig getrocknet und auf ein Glasbänkchen gelegt, das mit Hilfe einer Wasserwaage horizontal nivelliert ist. Mit vorgewärmter 3 ml Meßpipette werden nun jeweils 2,5 ml der heißen Gellösung auf die bereitstehenden Objektträger gegossen. Dabei beginnt man am besten in der Mitte der Plättchen und fährt man noch einmal mit der Pipettenspitze auf dem Rand entlang, um auch hier eine gleichmäßige Auftragung zu erreichen.

Ist die Agarschicht erstarrt, werden die Plättchen gestanzt, wobei sich die Stanzanordnung aus der Aufgabenstellung ergibt. In den meisten Fällen wurde ein zentraler Graben in der Länge des Objektträgers von ca. 1 bis 2 mm Breite und zwei Löcher rechts und links der Grabenmitte von ca. 1 mm Durchmesser ausgestanzt.

Mit Hilfe einer nicht zu stark eingestellten Wasserstrahlpumpe werden nun die ausgestanzten Gelstückchen ausgehoben (z.B. mit einer stumpfen 1 mm Kanüle) und mit 0,001 bis 0,002 ml Antigen (1 μ l - 2 μ l) gefüllt. Zum Füllen der Ausstanzungen haben sich bei uns die Mikropipetten "EPPENDORF" bewährt. Es werden mit der gelben Spitze nur kleine Tropfen herausgedrückt und den Ausstanzungen genähert. Bei Kontakt wird der Tropfen in die Ausstanzung gesaugt, ohne daß Gefahr für das Gel besteht.

3. Ausführung der Elektrophorese:

Die mit Antigen gefüllten Plättchen werden in die Elektrophoresekammer gelegt und gegebenenfalls (BOSKAMP) die Wasserkühlung eingestellt. Zur Herstellung des Kontaktes werden die bei der LBK-Apparatur mitgelieferten Rayon-Dochte oder ein mit Elektrodenpuffer getränkter Filtrierpapierstreifen mit einem Knickfals von 1 cm luftblasenfrei auf die Gelschicht aufgelegt. Dies wird dadurch gut erreicht, daß man vorher einen Tropfen Elektrodenpuffer auf das Gelende fallen läßt. Das andere Ende des Papierstreifens oder des Rayon-Dochtes hängt weit genug in den Elektrodenpuffer hinein. Wenn auf der Beschreibung zur Ausrüstung nichts anderes steht, werden 5 mA Stromstärke pro eingelegtes Plättchen eingestellt. Die Spannung beträgt ca. 140 bis 150 Volt, die Laufzeit 1 1/2 bis 3 Stunden je nach Apparatur.

Danach werden die zentralen Gräben ausgehoben, wobei man ein Gelmesser oder auch eine vorne abgestumpfte Kanüle mit Wasserstrahlpumpe verwenden kann. Die Grabenden müssen vorher vom übrigen Gel getrennt werden.

Ist der zentrale Graben mit Antiserum gefüllt (z.B. mit der Mikropipette 50 oder 100 μ l entsprechend 0,05 oder 0,1 ml) beginnt die Entwicklung der Präzipitationsbanden. Sie dauert 12 - 36 Stunden und muß in einer feuchten Kammer erfolgen.

Bei jeder Immunelektrophorese lief zur Kontrolle ein Präparat von normalem Humanserum und Anti-Humanserum vom Kaninchen mit, um die Ausbildung der charakteristischen Banden zu überprüfen.

E Nachbehandlung und Färbung der Präparate

1. Waschen:

Wenn die Banden voll entwickelt sind, muß vor dem Anfärben der Banden das überschüssige Eiweiß entfernt werden. Das gilt ganz besonders für esteraseaktive Proteine bei der sehr empfindlichen Esterasefärbung. Die Präparate werden in Entfärbeschalen gelegt und vorsichtig mit 1% NaCl-Lösung überschichtet. Wichtig ist, daß die Gefäße anschließend nicht mehr bewegt werden, da sich das Gel sonst leicht von den Objektträgern lösen kann und Verwechslungen möglich werden oder Risse im Gel entstehen können. Auch das Wechseln der Waschflüssigkeit muß vorsichtig erfolgen. Es darf weder zu stark abgesaugt noch hineingegossen werden. Verwendet man die "Rahmenmethodik" der LKB-Ausrüstung, sind die Präparate wesentlich geschützter. Zur Anfärbung mit Amidoschwarz, Säurefuchsin und Azocarmin genügt das 3-4malige Wechseln der NaCl-Lösung während einiger Stunden, z.B. nach einer, zwei und drei Stunden. Bei der Esterasefärbung kann eine über Tage dauernde Wässerung je nach eingesetzter Konzentration der Esterase notwendig werden. Eine Anfärbung nahmen wir in diesem Fall erst vor, wenn nach längerer Wässerung mit häufigen Wechseln der Spülflüssigkeit die Sulfosalicyl-Probe im Überstand mehrfach negativ blieb. Um das Angehen von Mikroorganismen zu verhindern, setzten wir einem Liter Spülflüssigkeit 1 ml 1% Merthiolat zu. Der letzte Spülgang wurde jeweils mit aqua dest. durchgeführt.

2. Trocknen:

Die Präparate werden auf eine wasserdichte Unterlage gebracht, ihre Oberfläche noch einmal reichlich mit Wasser benetzt und dann mit einem großen Stück Filtrierpapier völlig überdeckt. Es dürfen sich keine Luftblasen zwischen Gel und Filtrierpapier ausbilden. Gegebenenfalls müßten diese durch Wasser verdrängt werden. Je nach Luftfeuchtigkeit und Temperatur trocknet das Filtrierpapier verschieden schnell (in der Regel über Nacht). Ist es ganz trocken, so sind es auch die Präparate und das Papier kann entfernt werden. Wenn Papierfusseln an den Präparaten hängen bleiben, so können diese leicht mit etwas Wasser abgewaschen werden.

3. Färben:

Die Färbungen erfolgen alle mit getrockneten Präparaten.

a) Säurefuchsinfärbung: 0,2 g Säurefuchsin wird in einem Gemisch von 50 ml Methanol, 50 ml aqua dest. und 10 ml Eisessig gelöst. Das Präparat wird darin ca. 15 min. gefärbt. Entfärbt wird in der gleichen Lösung ohne Farbstoff, bis die gefärbten Banden sich deutlich vom bereits entfärbten Gel abheben (44).

b) Amidoschwarzfärbung: Es wird eine 0,5% Amidoschwarzlösung in einem Gemisch von 9 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig hergestellt. Die Präparate werden darin ca. 10-15 min. gefärbt und die nicht gebundene Farbe in ca. 15 min. wieder ausgewaschen. Das gleiche gilt für die Färbung mit Azocarmin (44).

c) Esterasefärbung: Die Substratfärbung auf esteraseaktive Präzipitationslinien im Gel erfolgte mit der Methode von URIEL (49) nach der Beschreibung von BACKHAUSZ (2) unter eigener Abwandlung. Als Substrat wurde α -Naphthylacetat-Lösung verwendet.

Ausführung:

50 ml eines m/15 Phosphatpuffers pH 7,4 und 2 ml einer α -Naphthylacetat-Lösung (1% Lösung von α -Naphthylacetat in 50% Aceton) werden in einem Erlenmeyerkolben von 100 ml, der in Eis steht, gemischt. Nach Zugabe von 25 mg Echt-Blau-Salz BB (Werk Naphtholchemie der Firma Höchst in Offenbach/Main) wird geschüttelt, bis eine grüne Flüssigkeit entsteht. Diese wird durch normales Filtrierpapier filtriert, wobei der Aufnahmebehälter wiederum in Eis steht.

Auf das Präparat mit getrockneter Agar-Schicht, das in einer Petrischale liegt, wird nun soviel Farbstofflösung gegeben, daß es eben bedeckt ist. Dann wird die Schale leicht geschwenkt. Sobald die erste Braunfärbung an den Präzipitaten auftritt, was unter Umständen bereits innerhalb von 15 sec. möglich ist, wird das Präparat entnommen und in kaltes Wasser gelegt, um eine Überfärbung zu vermeiden.

Mit dieser Färbung kann man selbst recht nahe beieinanderliegende esteraseaktive und nicht aktive Banden voneinander trennen. Anschaulich ließ sich das bei uns an der Esterasefärbung der Albuminbande zwischen Anti-Humanserum vom Kaninchen

und Humanserum zeigen, die eine leichte Braunfärbung nach einer relativ langen Reaktionszeit entwickelte, während die danebenliegenden Banden nicht gefärbt wurden. Vom Albumin-Antialbumin-Komplex ist bekannt, daß er eine geringe Esteraseaktivität hat (48).

F Dokumentation des Präzipitationsbildes durch Fotografie

Kontaktaufnahme: Die Präparate werden nach der Entwicklung oder als Verlaufskontrolle während der Entwicklung aus der feuchten Kammer entnommen und der Boden der Objektträger sorgfältig getrocknet. Dann legt man das Präparat auf Fotopapier Agfa-Lupex EH 1 (44) und belichtet nach Bedarf. Bei der Einstellung eines üblichen Vergrößerungsgerätes auf das Format 7 x 11 ergab sich bei uns eine Belichtungszeit von ca. 35 sec. bei Blende 16. Die richtige Belichtungszeit ist außerordentlich wichtig, da man mit zu starker Belichtung feine Banden auf dem Fotopapier nicht darstellen kann. Technisch besser werden die Aufnahmen, wenn man das fertig entwickelte und möglichst auch schon gewaschene Präparat mit Wasser überschichtet fotografiert.

Vergrößerungen: Will man die Vergrößerung des Präzipitationsbildes erreichen, schiebt man die Wasserkammer mit dem Präparat in den Zwischenraum des Vergrößerungsapparates, der normalerweise den Negativfilm aufnimmt. Auf diese Weise läßt sich auch jede beliebige Ausschnittvergrößerung herstellen. Die Belichtungszeiten liegen bei Format 7 x 1 ebenfalls bei ca. 40 sec. bei Blende 16, bei Vergrößerungen darüber entsprechend mehr. Eventuell wird eine Belichtungsreihe angefertigt.

Fotografien von gefärbten und getrockneten Präparaten sind wesentlich einfacher durchzuführen, ergeben aber ein technisch weniger zufriedenstellendes Ergebnis. Die Aufnahme vor und nach Esterasefärbung eignet sich besonders zum Aufdecken und zur Dokumentation von nicht primär sichtbaren esteraseaktiven Banden (Abb. 4).

G Quantitative Präzipitationsversuche

Wir bestimmten das Immunpräzipitat im Prinzip nach SCHULZE und SCHWICK (16, 42, 43), variierten jedoch Volumina, Reaktionszeit und die Schichtdicke der Küvetten.

1. Vorversuche

In einem Vorversuch zeigten wir, daß Linearität besteht zwischen der eingesetzten Menge an Immunpräzipitat und der Höhe der resultierenden Trübung.

Dazu wurde 0,05 ml bis 0,5 ml einer Suspension von gewaschenem Immunpräzipitat aus Reaktionen von Schweineleberesterase mit AS-Schweineleberesterase mit m/15 Phosphatpuffer pH 7,5 mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Nach einer halben Stunde auf dem Vibrator EPPENDORF (Mikrolitersystem EPPENDORF, Firma Netheler und Hinz, Hamburg) wurde die Extinktion bei 450 nm in 0,5 cm OS-Küvetten im Zeiss Spektralphotometer gemessen. Es ergab sich gute Linearität (Abb. 5). Somit kann die Trübungsmessung als Maß für die Menge des Immunpräzipitates verwendet werden.

Ein weiterer Vorversuch zeigt die Spaltung von o-Nitrophenylacetat durch Kaninchenserum (Methodik s.u.). Es zeigte sich, daß die Serumaktivität des Kaninchens nicht konstant ist, sie muß daher mitbestimmt und jeweils abgezogen werden.

2. Präzipitationsversuche mit ansteigenden Antigenmengen

Die Ansätze (in Mikrofugenröhrchen, Mikrolitersystem "EPPENDORF") enthielten jeweils 0,1 ml Antiserum gegen eines der Enzyme, 0,1 ml Antigenlösung entsprechender Verdünnung (1 - 200 µg Protein), wurden mit dem Vibrator gemischt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7,5 zugegeben und nochmals kurz gemischt. Die Ansätze verblieben 24 Stunden bei +4°C in der Kühlzelle. Später zeigte es sich, daß das Ergebnis nicht wesentlich anders ausfällt, wenn die Ansätze direkt photometrisch gemessen werden. Nach erneuter gleichmäßiger Durchmischung wurden die Extinktionen in 0,5 cm Küvetten im Zeiss-Spektralphotometer PM Q II bei 450 nm gemessen. Die Ansätze wurden dann wieder in die Mikrofugenröhrchen zurückgestellt und nach vorheriger Kühlung in der Mikrofuge 2,5 min. lang zentrifugiert.

3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Enzymaktivitäten wurden im Ansatz mit Trübung, im Überstand nach Zentrifugation und im gewaschenen Präzipitat mit dem o-Nitrophenylacetat- und teilweise mit dem Monoäthylglycin-2,6 xylidid-Test (19) überprüft.

o-Nitrophenylacetat-Test

- Lösungen:
1. 0,1 M Citratpuffer pH 6,5
 2. 0,002 M o-Nitrophenylacetatlösung
 3. Probenlösung oder Suspension

Die fertigen Lösungen werden eingefroren und sind in der Kühltruhe unbegrenzt lagerungsfähig. Nach dem Auftauen verbleibt die o-Nitrophenylacetat-Lösung im Eis, um eine nicht enzymatische Hydrolyse des Substrates zu verhindern.

Herstellen der Lösungen

zu 1) Citratpuffer pH 6,5

Es werden 53,7 ml Lösung A und 64,3 ml Lösung B gemischt, der pH kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt.

Lösung A: 21,008 g Citronensäure H_2O + 200 ml 1n NaOH auf 1 l H_2O

B: 0,1 n NaOH

zu 2) o-Nitrophenylacetat-Lösung

36,2 mg o-Nitrophenylacetat werden in 1,6 ml Acetonitril als Lösungsvermittler gelöst. Danach wird auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

Normalausführung:

Das Gesamtvolumen im Ansatz beträgt 2 ml. Versuchstemperatur 25. ° C. Messung bei 405 nm im EPPENDORF-Photometer, Fa. Netheler und Hinz; 1 cm OS-Küvetten.

In die Leerküvette werden 2 ml Citratpuffer eingefüllt, in die Meßküvette 1,6 ml der o-Nitrophenylacetat-Lösung. Die Menge des dann zugefügten Citratpuffers ergänzt sich mit der verwendeten Enzymmenge zu 0,4 ml.

Mit der Leerküvette wird die Skala des Photometers auf "0" geeicht. Die Reaktion wird durch Zugabe des Enzyms und nach intensiver Durchmischung gestartet. Gemessen wird die lineare Extinktionszunahme des o-Nitrophenols innerhalb von 2,5 min. Zur Beurteilung der Linearität wird die Extinktion nach jeweils 30 sec. abgelesen. Die Differenz zwischen den Werten nach 180 und nach 30 sec. nach dem Start ergibt die Extinktionszunahme innerhalb von 2,5 min.

Schnellausführung:

Sind größere orientierende Bestimmungen durchzuführen und ist die Linearität der Extinktionszunahme durch den Normaltest ausreichend erprobt, bietet sich der Schnelltest an.

Dabei werden 1,9 ml o-Nitrophenylacetat-Lösung in die Meßküvette pipettiert. Durch Zugabe von 0,1 ml der Untersuchungslösung und inniger Durchmischung mit Hilfe eines am Ende gebogenen Stäbchens wird die Reaktion gestartet.

Der Extinktionsanzeiger ist knapp unter die Null-Marke gestellt. Sobald er die Null-Marke passiert, wird die Stoppuhr gestartet und der erhaltene Extinktionswert nach 30 sec. notiert. Über den molaren Extinktionskoeffizienten $E = 1,6$ wird die Extinktionszunahme in der Minute in internationale Einheiten umgerechnet (23).

4. Bestimmung des Proteingehaltes in den Immunpräzipitaten

Um abzuklären, ob zwischen den bei 450 nm gemessenen Ansatztrübungen und dem Proteingehalt in den Niederschlägen eine lineare Beziehung besteht, wurde das Immunpräzipitat zusätzlich nach dem Mikro-Biuretverfahren bestimmt.

Ausführung:

Das Präzipitat wird mit 0,9% eiskalter NaCl-Lösung zweimal gewaschen. Zum Zentrifugieren wird die Mikrofuge EPPENDORF benutzt. Der Überstand wird jeweils vorsichtig mit einer ausgezogenen Kapillare abgesaugt.

Der gewaschene Niederschlag wird in 0,5 ml Biuret-Reagenz (500 μ l Mikropipette) aufgewirbelt und ca. 30 min. auf dem Vibrator geschüttelt.

Erst nach einer Stunde wird die Extinktion bestimmt (546 nm, 2 cm Mikroküvetten, gegen Wasser).

Abbildung 6 zeigt die Kurve, die man erhält, wenn auf der Abszisse die Trübung und auf der Ordinate die dazugehörigen Biuret-Werte in μ g aufgetragen werden. Es ergibt sich eine Gerade. Die Biuret-Werte liegen in den höheren Trübungsbereichen etwas unter der Geraden; vielleicht sind die Präzipitationsmengen schon zu groß. Die Steigung der Geraden ist 1,1, der Abschnitt auf der Ordinate 66. Die Funktionsgleichung lautet somit $y = 1,1 \cdot x + 66$. Mit ihr kann man die Trübungswerte in Biuret-Protein umrechnen. Bei anderen Trübungsversuchen wird es nötig sein, die Gleichung durch einige Eichpunkte neu zu bestimmen.

H Titration der aktiven Zentren von Esterasen mit E 600 bzw. BNPP

Es zeigte sich bei den vergleichenden Untersuchungen der Esterasen verschiedener Herkunft, daß es nicht immer ausreichte, gleiche Proteinmengen (Biuret) als Vergleichsbasis einzusetzen. Wir gingen daher später dazu über, uns auf die Anzahl der mit E 600 bzw. BNPP (18) titrierbaren Zentren zu beziehen.

Materialbedarf: 2 x 2 cm Mikroküvetten EPPENDORF, 1 ml Meßpipette für Puffer, 0,5 ml ADH Pipette für die E 600 Lösung, 0,1 oder 0,2 ml Blutzuckerpipette für das Enzym.

Erforderliche Lösungen:

1. 0,1 m Trispuffer pH 8,0
2. Hemmstofflösung 0,001 m E 600 bzw. BNPP
36,2 mg BNPP-Na werden auf 100 ml aqua dest. gelöst oder es wird vorhandene E 600-Stammlösung (23) im Verhältnis 1:12 verdünnt (0,83 ml auf 10 ml).
3. Enzymlösung
Es soll etwa 0,1 bis 0,7 mg hochgereinigte Esterase pro Testansatz verwendet werden. Dies entspricht 2 - 12 nm bei aktiven Zentren und einem Molekulargewicht von 164 000.

Ausführung:

- a) 2 cm Mikroküvetten EPPENDORF bei 405 nm mit Puffer gegeneinander messen. Eventuelle Differenz notieren. Der Puffer wird aus einer Küvette mit dafür vorgesehener Pumpe abgesaugt.
- b) Bestimmung des Hemmstoffleerwertes gegen die mit Puffer gefüllte Küvette: 0,7 ml Trispuffer und 0,2 ml Hemmstofflösung werden mit einer 200 µl Mikropipette gemischt (dreimaliges Aufsaugen und Zurückspritzen). Die bei 405 nm gegen Puffer gemessene Extinktion ergibt den Hemmstoffleerwert. Die Küvette, die den Hemmstoffleerwert enthielt, wird gereinigt, indem sie fünfmal mit aqua dest. gefüllt und wieder abgesaugt wird. Beim letzten Mal wird mit Puffer nachgespült.
- c) Meßansatz: 0,5 ml Trispuffer pH 8,0 und 0,2 ml Enzymlösung werden gemischt (Mikropipette). Dann wird die Extinktion gegen Puffer bei 405 nm gemessen. Dann Zugabe von 0,2 ml E 600 Lösung mit der ADH-Pipette und erneutes Mischen

mit der 200 µl Mikropipette durch dreimaliges Aufsaugen und Zurückspritzen. Ablesen der Extinktion nach einer, zwei und drei Minuten. Endwert dient zur Berechnung.

Berechnung und Beispiel:

Die Korrektur des Enzymleerwertes muß erfolgen, da durch Zugabe der Hemmstofflösung eine Verdünnung von 0,7 auf 0,9 ml erfolgt ist. Somit ist der Korrekturfaktor $= \frac{7}{9}$.

Der Gesamtleerwert (GLW) ergibt sich aus der Summe von Hemmstoffleerwert (HLW) und korrigiertem Enzymleerwert (korr. ELW). $GLW = \text{korr. ELW} + \text{HLW}$.

Um µMol aktive Zentren pro ml Enzymlösung zu erhalten, muß von der erhaltenen Extinktion bei 405 nm der GLW abgehalten werden, bevor mit dem Faktor $\frac{V}{16,44}$ multipliziert wird.

$$V = \frac{\text{Ansatzvolumen}}{\text{eingesetzten ml} \times \text{Schichtdicke}} = \frac{0,9}{0,2 \times 2} = 2,25$$

Die im Nenner stehende Zahl (16, 44) ist durch den Extinktionskoeffizienten des entstehenden p-Nitrophenols bedingt.

Beispiel: Keine Differenz der verwendeten Küvetten; Hemmstoffleerwert 0,008;
Enzymleerwert 0,121; korr. ELW 0,0094; GLW 0,102; $E_{405} = 0,275$;
 $E_{405} - \text{GLW} = 0,173$

$$\begin{aligned} \mu\text{Mol akt. Zentren pro ml Enzymlösung} &: \frac{2,25 \times 0,173}{16,44} \\ &= \underline{\underline{22,3 \times 10^{-3}}} \end{aligned}$$

ERGEBNISSE

1. Prüfung der Enzympräparationen auf Einheitlichkeit

1. Vergleichende radiale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY und radiale lineare Doppeldiffusion

Immunologische Methoden gehören zu den empfindlichsten Kriterien zur Beurteilung der Reinheit von Proteinen. Bei der Doppeldiffusion unterrichtet die Zahl der Präzipitationszonen über die Mindestzahl der reagierenden Antigen-Antikörper-Systeme. Die Antiseren wurden in unseren Versuchen durch Immunisieren von Kaninchen gewonnen. Die Aussagekraft der Untersuchungen ist somit limitiert durch Immuntoleranzen, die bei dieser Tierart vorkommen.

a) Prüfung der Reinheit von Schweineleberesterase mit Hilfe der radialen-linearen Doppeldiffusion (Abb. 7)

Durch Vorversuche wird die optimale Antigenkonzentration ausgetestet bei Verwendung von nativen oder aus Lyophilisat hergestellten Antiseren.

Gegenübergestellt sind zwei verschiedene Präparationen von Schweineleberesterase in ausgestanzten Löchern und Antiserum gegen Schweineleberesterase (AS-Schweineleberesterase) in dem longitudinalen, linearen Graben. Die ausgestanzten Löcher sind mit 1, 2 oben und 3, 4 unten bezeichnet. In 1 und 3 sind aufgrund des kleineren Behälters die geringeren Antigenmengen (2 μ l bzw. 5 μ l). In Behälter 3 und 4 findet sich die Schweineleberesterasepräparation, mit der immunisiert wurde. In der gewählten Anordnung ist also eine gesicherte Beurteilung der Reinheit nur bei dem Antigen in den unteren Behältern möglich. Eine vorhandene Verunreinigung kann nicht entdeckt werden, wenn sie nicht auch in der Präparation enthalten war, mit der immunisiert wurde. Nach einer Diffusionszeit von 18 Stunden zeigen sich 4 einheitliche Banden (läßt man weiter diffundieren, treten an den Banden der kleineren Behälter Unschärfen auf, die esteraseaktiv sind und später noch besprochen werden, siehe Seite 29).

Es liegt also jeweils mindestens ein Antigen-Antikörper-System vor. Eine weitergehende Aussage ist nicht möglich, da dieses Antigen-Antikörper-System ja z.B. von einem zweiten überlagert sein kann.

Außerdem sind weitere Diffusionsversuche mit variierten Konzentrationen erforderlich. Es kommt darauf an, eventuell vorhandene Äquivalenzpunkte von Antigen-Antikörper-Systemen zu finden, die Verunreinigungen zuzuordnen sind. Wie es gelingt, durch dieses Vorgehen schwache Verunreinigungsbanden deutlicher hervortreten zu lassen, ist bei der Beurteilung der Reinheit von Schweinenierenesterase näher aufgezeigt.

Ebenfalls von Bedeutung kann die Diffusionszeit für die Ausbildung von Verunreinigungsbanden sein. Dies wird deutlich an einem Beispiel, in dem eine andere Schweineleberesterasepräparation (Fraktion 65,8% Ammonsulfatsättigung) im "Makro-OUCHTERLONY" in Petrischale mit rosettenförmiger Ausstanzung gegen seine Antikörper diffundiert. Die Abb. 8 zeigt das Präparat nach einer Diffusionszeit von 24 Stunden und 2 1/2 Tagen. Nach der kurzen Diffusionszeit findet sich eine durchgehende, wabenförmig aussehende, deutliche Bande, die von einem nicht gut abgrenzbaren Saum begleitet wird. Nach 2 1/2 Tagen hat sich der Saum zu zwei schwachen, aber sichtbaren, kreisförmigen Nebenbanden differenziert, die die Hauptbanden einhüllen. Es ist also anzunehmen, daß in dieser Präparation mindestens zwei Verunreinigungen enthalten sind, gegen die Antikörper gebildet werden.

Das Antigen-Antikörper-Präzipitat ist noch enzymatisch aktiv (siehe unten, Abschnitt IV.). Daher kann durch eine Substratfärbung mit α -Naphthylacetat entschieden werden, ob eine Präzipitationslinie auf dem Vorhandensein von Esterase oder von Begleitprotein beruht. Im deutlichen Gegensatz zur Hauptbande lassen sich die beiden kreisförmigen Nebenbanden nicht anfärben.

Die Präzipitationsbanden sind gerade. Nach BACKHAUSZ (2) ergeben sich im OUCHTERLONY-Test gerade Linien, wenn die Diffusionskonstanten der beiden Reaktionspartner etwa gleich sind. Dies ist in unserem System annähernd der Fall: der $D_{20,w}^0$ -Wert beträgt für Schweineleberesterase 4,5 (5) und für 7 S Gamma-Globulin vom Rind 4,1 (38). Das Molekulargewicht unserer Carboxylesterasen (166 300) ist mit dem der 7 S Gamma-Globuline fast identisch (4, 5, 21, 12).

b) Prüfung der Reinheit von Schweinenierenesterase

Wie oben ausgeführt müssen die Konzentrationsverhältnisse in den Diffusionsversuchen variiert werden, um auch in den Bereich für die Optima eventueller Verunreinigungen zu kommen. Abb. 9 zeigt ein Beispiel für Schweinenierenesterase.

Die zum Antigenbehälter 1 gehörenden Banden gegen beide Gräben erscheinen einheitlich. Bei genauer Betrachtung findet sich ein leichter Schleier auf der konkaven Seite der unteren Bande. Bei Einsatz einer höheren Antigenkonzentration (Behälter 2) wird der Schleier deutlicher. Bei den Banden des Schweinenieren-Enzyms, das nach weiterer Umfällung erhalten wurde und deutlich konzentrierter ist, sieht man nun eine scharfe, dünne Begleitbande und eine weitere, breite und zarte Bande im stärkeren Antigen-Konzentrationsbereich.

Die beschriebenen Verunreinigungsbanden konnten bei Diffusion gegen normal konzentriertes AS-Schweinenierenesterase nicht gefunden werden. Das Ergebnis in Behälter 3 zeigt, daß unter Umständen die Konzentrierung beider Reaktionspartner zum Ziel führt.

Erwähnt muß noch werden, daß sich die gefundenen Verunreinigungsbanden auch bei der spezifischen Färbung als nicht esteraseaktiv erwiesen. Dies ist zur Abgrenzung gegenüber Artefakten wichtig.

c) Artefakte bei langen Diffusionszeiten und beim Arbeiten in Bereichen außerhalb des Enzym-Äquivalenzbereiches

Bei der Suche nach möglichen Verunreinigungen im Bereich stärkeren Antikörperüberschusses machten wir folgende Beobachtung: Bei Verringerung der Antigenkonzentration kam es zur Ausbildung einer größeren Anzahl von Parallelbanden zur erstentwickelten Hauptbande. Angedeutet findet sich das Phänomen in Abb. 7 bei den Antigenbehältern 1 und 3, also bei den geringeren Antigenkonzentrationen. Die Banden werden von einer weißlichen Zone begleitet, die den Beginn der Aufsplitterung der Hauptbanden darstellt. Aus Abb. 10 geht hervor, daß das Ausmaß der Bandenaufsplitterung von der Diffusionszeit abhängt. Bei den drei Präparaten gleicher Anordnung wurde die Diffusion nach 14, 36 und 72 Stunden abgebrochen. Die er-

haltenen Bilder nach Esterasefärbung zeigen die Abbildungen im Negativ und Positiv. Alle Banden sind esteraseaktiv. Es wurden verschiedene Esterasepräparationen aus Schweineleber, Schweinenieren und Rinderleber bei einer radialen-linearen Doppeldiffusion mit AS-Schweineleberesterase eingesetzt. Nach kurzer Diffusion sind fast alle Banden einheitlich (auf Konfluenz und Spornbildung wird unten eingegangen).

Bei Antigenbehälter 5, 6 und 9 deuten sich soeben die ersten artifiziellen Doppelbanden an. Werden die Diffusionszeiten länger, werden auch die Parallelbanden immer zahlreicher und sind nach extrem langen Diffusionszeiten (mehr als eine Woche) fast nicht mehr zählbar. Es spricht vieles dafür, daß es sich hierbei um periodische Präzipitationen (LIESEGANGSches Phänomen) handelt.

2. Immunelektrophorese

Bei der Beurteilung der Einheitlichkeit von Proteinen ist die Immunelektrophorese der Doppeldiffusion überlegen. Aufgrund der vorangegangenen elektrophoretischen Trennung der Antigene ist die Wahrscheinlichkeit, daß sich zwei Präzipitationsbanden zufällig decken, wesentlich geringer.

Die Ergebnisse immunelektrischer Untersuchungen mit Schweineleber- und Schweinenierenesterase sind in Abb. 11 wiedergegeben. Aus Teil A der Abbildung geht hervor, daß die hierbei verwendete Schweineleberesterase nur eine Präzipitationsbande gegen ihr Antiserum erkennen läßt. Demgegenüber zeigt nach dem üblichen Verfahren (13) isoliertes Schweinenierenenzym gegen ein Antiserum neben der Hauptbande noch eine weitere, im Bereich höherer Antigenkonzentrationen liegende, schwache Nebenbande sowie rechts an die Hauptbande anschließend noch eine sehr feine dritte und vierte Bande (Teil B der Abb. 11).

Diese Verunreinigungen - sie zeigen keine Esteraseaktivität - können durch weitere Reinigungsschritte (nochmalige Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 und Ammoniumsulfatfällung) weitgehend entfernt werden. Im Teil C der Abb. sind sie nicht mehr nachweisbar. Unter besonders optimalen Darstellungsbedingungen sind jedoch auch in diesem Fall noch zwei sehr schwache Nebenbanden erkennbar.

Die elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten von Schweineleber- und Schweinenierenesterase sind bei der Immunelektrophorese etwa gleich. Dies steht in

Übereinstimmung mit früheren Befunden (11, 12) an Papierelektrophorese und Hochspannungselektrophorese auf Stärkegel. Ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Esterasen vom Schwein zeigt die Rinderleberesterase bezüglich der Wanderungsrichtung (Abb. 12). Während jene zur Anode wandern, wandert RiLE unter den hier angegebenen Bedingungen kathodisch. In der Hochspannungselektrophorese an Stärkegel wanderte RiLE bei früheren Untersuchungen (4) anodisch. Verunreinigungen der Rinderleberesterase konnten bei dieser Versuchsanordnung nicht gefunden werden. Bei der Gegenüberstellung in Abb. 12 wurde auch Schweineleberesterase nach einer Präparationsmodifikation aus Aceton-Trockenpulver eingesetzt. Die aus Acetonpulver isolierte Schweineleberesterase zeigt immunologisch kein anderes Verhalten als die übliche Präparation.

II. Untersuchungen zur Frage der immunologischen Identität bzw. Verwandtschaft

Aus den Abbildungen (z.B. 2, 4, 8, 10) geht hervor, daß die Präzipitationsbanden von Schweineleber- und Schweinenierenesterase gegen AS-Schweineleberenzym konfluieren.

Schweineleber- und Rinderleberesterase zeigen dagegen eine partielle Konfluenz mit deutlicher Spornbildung, wobei ein Teil der Bande des Schweineleberenzym weiterläuft. In Abb. 13 ist dies vergrößert dargestellt. Partielle Konfluenz wird auch zwischen den Banden von Rinderleber- und Schweinenierenenzym gegen AS-Schweineleberesterase beobachtet.

Bei Diffusionen der drei Enzympräparationen gegen AS-Schweinenierenenzym ergibt sich das in der unteren Hälfte der Abb. 2 dargestellte Bild. Auch in diesem Fall gehen die Banden von Schweineleber- und Schweinenierenenzym kontinuierlich ineinander über. Bei der Rinderleberesterase läßt sich dagegen - überraschenderweise - keine Präzipitationsbande erkennen. Die hochempfindliche Substratfärbung deckt jedoch auch hier die vorhandene Bande auf. In Abb. 4 ist das Sichtbarwerden dieser Bande durch Esterasefärbung gezeigt. Dabei ist auffällig, daß die nun erhaltene Bande zwischen Rinderleberesterase und AS-Schweinenierenesterase deutliche Zeichen des Antigenüberschusses aufweist; die breite, unscharfe Bande sitzt dem Antikörpergraben breitbasig auf.

Zur Ergänzung dieser Befunde haben wir Versuche durchgeführt, bei denen AS-Schweineleberenzym zur Absorption der Antikörper mit jeweils einem der drei Antigene im Überschuß vorinkubiert wurde. Der Überstand nach Zentrifugation wurde im Doppeldiffusionsversuch auf verbliebene Antikörper geprüft (Abb. 14). Als Vergleich wurde im oberen Graben natives AS-Schweineleberesterase eingesetzt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- a) Keines der Antigene bildet gegen AS-Schweineleberesterase, das mit Schweineleberenzym vorinkubiert wurde, eine Bande. Die gegen natives AS-Schweineleberesterase erhaltene Bande zeigt keine Auffälligkeit im Verlauf der freien Schenkel.
- b) Mit Schweinenierenenzym vorinkubiertes AS-Schweineleberesterase reagiert mit Schweinenierenesterase und Rinderleberesterase mit Sicherheit nicht, während die Beurteilung beim Antigen Schweineleberesterase zuerst nicht sicher gelang. Nach Säurefuchsinfärbung ließ sich keine Bande entdecken (15). Nach Entfärbung und bei Wasserüberschichtung war im schräg auffallenden Licht jedoch eine angedeutete Bande erkennbar. Für das Vorhandensein einer Bande spricht auch die Tatsache, daß die Schenkel der Bande gegen das native AS-Schweineleberesterase zur Mitte hin einlenken (32).
- c) Mit Rinderleberesterase vorinkubiertes AS-Schweineleberesterase reagiert noch mit Schweineleber- und Schweinenierenenzym unter Bildung einer schwachen Bande. Gegen Rinderleberenzym bildet sich keine Bande mehr aus. Der Bandenbogen gegen das native Serum ist offen. Obgleich die Rinderleberesterase sicherlich im Überschuß zugegeben war, konnte sie nicht alle vorhandenen Antikörper abfangen. Die im Bild sichtbare Parallelbande erklärt sich so, daß nach der Inkubation verbliebene Rinderleberenzym mit Antikörpern aus dem oberen Graben reagiert hat.

III. Quantitative Immunpräzipitationskurven

Antiseren gegen Schweineleberesterase bzw. Schweinenierenesterase wurden mit steigenden Mengen der entsprechenden Antigene inkubiert und das gebildete Immunpräzipitat an Hand der Trübung quantitativ bestimmt. Nach Zentrifugation wurde

ferner die Esteraseaktivität im Überstand (Substrat o-Nitrophenylacetat) bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 15, 16, 17, 18, 21 dargestellt. Die Abb. 15 unten zeigt die erhaltene Kurve bei Verwendung von Schweineleberesterase und dem dazugehörigen Antiserum. Die Kurve der Trübung ergibt einen typischen Verlauf mit zunächst steilem Anstieg der Präzipitationsmenge, einem deutlichen Maximum (Äquivalenzpunkt) bei etwa 50 µg Schweineleberenzym und anschließenden langsamen Abfall. Letzterer ist, wie auch bei zahlreichen anderen immunologischen Systemen bekannt, auf eine teilweise Auflösung bzw. Bildungshemmung des Antigen-Antikörper-Präzipitates im Antikörperüberschuß zurückzuführen. Im ansteigenden Teil der Kurve, d.h. bei Antigenüberschuß ist praktisch keine Esteraseaktivität im Überstand nachweisbar. Dagegen beginnt die Aktivität beim Überschreiten des Äquivalenzpunktes steil anzusteigen.

Einen analogen Versuch mit gleichem Antiserum und Schweinenierenenzym als Antigen zeigt Abb. 15. Es fällt auf, daß in diesem Fall etwa die doppelte Menge Antigen, nämlich etwa 100 µg Schweinenierenenzym, benötigt wird, um die quantitativ gleiche Präzipitation zu erreichen. Dies erweckt den Eindruck, als könne Schweinenierenesterase nur halb so viele Antikörper aus AS-Schweineleberesterase binden wie die Schweineleberesterase selbst, was auf einen Unterschied zwischen den beiden Antigenen hinweisen würde (15).

Ein besseres und von der Reinheit der Enzympräparationen unabhängiges Bezugssystem ist die Menge des aktiven Enzyms, die bei den Serinhydrolasen durch Titration der aktiven Zentren mit Hilfe von Organophosphat-Inhibitoren, wie z.B. E 600, leicht experimentell ermittelt werden kann. Die Ergebnisse der quantitativen Immunpräzipitation bei Bezug auf titrierte Zentren sind in den Abb. 16, 17, 18 wiedergegeben. Auf der Abszisse ist jeweils die Menge des eingesetzten Enzyms eingetragen. Als Einheit sind 10^{-11} Mol aktive Zentren gewählt.

Die Präzipitationskurven der drei Ansätze AS-Schweineleberesterase und Schweineleberesterase, AS-Schweinenierenesterase und Schweineleberesterase und AS-Schweinenierenesterase mit Schweinenierenesterase unterscheiden sich nicht grundlegend voneinander. Sie steigen relativ steil an, zeigen ein gestrecktes aber erkennbares Maximum und fallen langsam ab. In den Bereich des gestreckten Maximums fällt auch der Beginn der Enzymaktivität im Überstand nach Zentrifugieren.

Die Kurve der Enzymaktivitäten im Trübungsansatz ist linear sowohl bei Einsatz von

Schweineleberesterase als auch von Schweinenierenesterase als Antigen (Abb. 16, 17, 18). Die Steigung der Geraden ist bei Verwendung von Schweinenierenesterase als Antigen geringer. Die Aktivitäten im Trübungsansatz entsprechen den eingesetzten Esterasen. Sie steigen auch oberhalb des Äquivalenzpunktes, d.h. im Antigenüberschuß, weiter linear an. Dies spricht dafür, daß sich die Aktivitäten des freien Enzyms und des als Immunpräzipitat vorliegenden Enzyms nicht nennenswert unterscheiden.

Die graphische Darstellung der Aktivitäten in den Überständen ergibt Geraden. Die gefundenen Steigungsunterschiede können nicht als gesichert gelten. Die Schnittpunkte mit der Abszisse sind die Äquivalenzpunkte. Sie stellen den Beginn der Esteraseaktivität in den Überständen dar. Wird AS-Schweinenierenesterase verwendet, liegt der Äquivalenzpunkt bei geringeren Enzymmengen, bei ca. 15 - während bei der Verwendung von AS-Schweineleberesterase der Äquivalenzpunkt bei etwas 30×10^{-11} Mol aktive Zentren liegt.

Dies dürfte wohl am ehesten für einen geringeren Antikörpergehalt von AS-Schweinenierenesterase sprechen, der auch aus vorangegangenen Versuchen schon vermutet werden konnte. Auf einen Unterschied zwischen den Antigenen zu schließen, erscheint bei der komplexen Natur der Antikörperbildung nicht möglich.

Wesentlich ist, daß der Äquivalenzpunkt bei der Versuchsanordnung unabhängig vom eingesetzten Enzym durch das Antiserum bestimmt war.

IV. Zur Stöchiometrie des AG-AK-Komplexes

Wir untersuchten die Antigen-Antikörper-Bindung in der Präzipitationsreihe von Schweinenierenesterase mit AS-Schweineleberesterase. Nach dem Mikrobiuret-Verfahren (28) wurden von der Präzipitationsreihe zu Abb. 15 oben die Proteinwerte der Niederschläge bestimmt.

Bei der weiteren Betrachtung gehen wir davon aus, daß das verwendete Enzym 100% rein war.

Aus Tabelle I läßt sich entnehmen, daß bei Einsatz von 2 µg Enzym in der Präzipitationsreihe ein Niederschlag von 101 µg resultiert. Da sich im Überstand keine

nachweisbare Aktivität mehr findet, ist anzunehmen, daß sich das Enzymprotein mit im Niederschlag befindet. Dann bleibt innerhalb des Antigen-Antikörper-Komplexes der Rest von 99 μg für die Antikörper. Eine vergleichende Immunelektrophorese macht wahrscheinlich, daß die Antikörper im AS-Schweineleberesterase den γ G-Globulinen angehören (s.S. 6 und Abb. 3). Form und Lage der Präzipitationsbanden im OUCHTERLONY-Doppeldiffusionsversuch sprechen für die Annahme eines etwa gleichen Diffusionskoeffizienten des Enzyms und seiner Antikörper und für etwa gleiches Molekulargewicht (Enzym 166 000 (21), γ G-Globulin ca. 160 000). Bei gleichem Molekulargewicht stehen die Gewichte im gleichen Verhältnis wie die Moleküle. Im gewählten Beispiel ergibt sich, daß das molare Verhältnis Antigen/Antikörper etwa 1:50 beträgt.

Tabelle I zeigt das Ergebnis der anderen Verhältnisrechnungen. Abhängig von der eingesetzten Enzymmenge variiert das Verhältnis Antigen zu Antikörper deutlich. In den Abbildungen 19 A und 19 B ist die Beziehung von eingesetztem Enzym und gefundenem Antigen-Antikörper-Verhältnis doppelt logarithmisch aufgetragen. Verbindet man die erhaltenen Punkte kontinuierlich, ergibt sich eine Kurve, wie sie Abb. 19 A zeigt. Abb. 19 B läßt eine lineare Abhängigkeit möglich erscheinen. Welche Darstellung vorzuziehen ist, müssen von größerem Untersuchungsmaterial ausgehende statistische Berechnungen zeigen. Die beiden gestrichelten Geraden zeigen den Streubereich an. Die Schnittpunkte mit der y-Achse liegen bei 1,8 und 1,94, die mit der x-Achse bei 2,8 und 3,0.

Ein besonderes Interesse verdient auch hierbei der Äquivalenzbereich, in dem - abhängig vom Präzipitationssystem - u.U. anzunehmen ist, daß gerade alle Antikörper vom eingesetzten Enzym gebunden werden.

Mit Hilfe des Quotienten AG/AK kann man bei bekanntem Molekulargewicht des eingesetzten Enzyms die Zahl der präzipitierten Antikörpermoleküle annähernd bestimmen. Bei Zweifel darüber, ob im Äquivalenzpunkt wirklich alle Antikörper präzipitiert sind, kann das erhaltene Ergebnis als Mindestantikörpergehalt gelten.

Die Antikörpergehalte der Präzipitationsreihe zu Abb. 15 oben, die aufgrund dieser Überlegungen errechnet wurden, steigen bis zum Äquivalenzpunkt an (100 μg). Beim zweifachen Antigengehalt (200 μg) ist die Zahl der Antikörper schon wieder deutlich abgefallen.

Der Maximalwert oder Mindestantikörpergehalt betrug in dem Beispiel $1,64 \times 10^{16}$ Antikörpermoleküle pro ml AS-Schweineleberesterase. Bei Einsatz der doppelten Enzymmenge war der Antikörpergehalt im Niederschlag auf weit unter die Hälfte ($0,58 \times 10^{16}$) abgefallen.

V. Versuche zur Frage der Beziehungen zwischen Antikörperbindung und aktivem Zentrum von Carboxylesterasen

1. natives Enzym

Die durch Reaktion mit Schweineleber-, Schweinenieren- und Rinderleberenzym mit Antiserum erhaltenen Immunpräzipitate sind noch enzymatisch aktiv. Das kann durch Färbung der Präzipitationslinien in Gel mit α -Naphthylacetat als Substrat qualitativ nachgewiesen werden. An den Stellen, an denen das Substrat enzymatisch gespalten wird, entsteht α -Naphtol, das dann mit einem Diazoniumsalz zu einem schwer löslichen Farbstoff umgesetzt wird. Mit dieser sehr empfindlichen Färbung ergeben Esterasenbanden intensiv braunrote, scharfe Banden. Immunpräzipitate anderer Proteine, z.B. die Nebenbanden in Abb. 8, 9 reagieren nicht.

Die Esteraseaktivität des Antigen-Antikörperpräzipitates zeigt sich des weiteren auch an der Aktivitätsdifferenz zwischen Trübungsansatz und Überstand nach Zentrifugieren (Abb. 15-18 u. 21). Die Differenz ist in der Regel im Äquivalenzpunkt maximal groß. Bei Antiseren von nur kurzfristig immunisierten Kaninchen entsprach die Aktivität im Trübungsansatz der insgesamt eingesetzten Aktivität. Auch der lineare Verlauf der Aktivitäten im Trübungsansatz über den Äquivalenzpunkt hinaus zeigt, daß bei kurzfristig immunisierten Tieren die Aktivität des Enzyms im Präzipitat unverändert bleibt (Abb. 16, 17, 18). Oberhalb des Äquivalenzpunktes ist ein Gemisch von freiem und im Präzipitat gebundenen Enzym zu erwarten. Wäre die Enzymaktivität im Niederschlag vermindert, müßte nach dem Äquivalenzpunkt ein steilerer Anstieg erfolgen. Nach Langzeitimmunisierung fiel bei der Bilanzierung der Aktivitäten ein deutlicher Verlust auf (Abb. 21). Es konnte z.T. nur wenig mehr als die Hälfte der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden.

Es erscheint somit nicht ausgeschlossen, daß Kaninchen nach längerer Immunisierung inhibierende Antikörper bilden, die gegen das aktive Zentrum direkt oder räumlich

benachbarte Strukturen gerichtet sein können (2, 49).

Ebenso wie im Versuch mit freiem Enzym kann die Esteraseaktivität auch im Antigen-Antikörper-Präzipitat durch E_{600} (10^{-5} M) vollständig gehemmt werden.

2. phosphorylierte Enzymderivate

Durch Behandlung von Carboxylesterasen mit E_{600} (23) oder Phosphorsäure-bis-(p-Nitrophenyl)ester (18) erhält man enzymatisch inaktive, phosphorylierte Enzymderivate. Es war die Frage, ob diese noch mit homologem Antiserum unter Bildung eines Präzipitates reagieren können. Die Abb. 20 zeigt, daß die Fähigkeit zur Antikörperbindung und zur Präzipitation nach Phosphorylierung der Carboxylasen erhalten bleibt.

Weiterführende quantitative Untersuchungen wurden zu diesem Punkt noch nicht durchgeführt.

3. Einfluß von Photooxydation, Dodecylsulfat und Hitzenaturierung

Schweineleberesterase reagiert nach Photooxydation in Gegenwart von Methylenblau (24) sowie nach Behandlung mit Natriumdodecylsulfat und nach Hitzenaturierung nicht mehr unter Präzipitatbildung mit Antiserum gegen das native Enzym.

DISKUSSION

Immunologische Methoden haben sich auch bei uns zur Prüfung von Enzympräparationen auf Einheitlichkeit bewährt. Bei zahlreichen Präparationen von Schweineleber- und Schweinenierenesterase fanden sich zwei bis drei Fremdkomponenten, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Proteine handelt. Durch weitere Reinigungsschritte konnten diese weitgehend entfernt werden. Die Nebenbanden waren bei den reinsten Präparationen selbst unter optimalen Darstellungsbedingungen nur noch andeutet erkennbar. Die Substratfärbung der AG-AK-Präzipitate mit α -Naphthylacetat war bei der Prüfung auf Reinheit zur Abgrenzung gegenüber Verunreinigungsbanden sehr nützlich (49). Eine quantitative Abschätzung der Verunreinigungen erscheint schwierig. Die Präzipitationsversuche weisen darauf hin, daß sie vermutlich beim Schweinenierenenzym quantitativ ins Gewicht fallen.

Wir haben früher gezeigt (11, 12, 22), daß sich unsere Präparationen, auch Schweinenierenesterase, nach verschiedenen anderen Kriterien einheitlich verhielten. An diesem Beispiel wird einmal mehr die Empfindlichkeit immunologischer Methoden in der Reinheitsprüfung von Proteinen deutlich. Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß sich häufig die Verunreinigungen nicht mühelos nachweisen lassen und die optimalen Bedingungen zu ihrer Darstellung gesucht werden müssen. So ist durchaus denkbar, daß sich Verunreinigungsbanden im Äquivalenzbereich des Enzym-Antikörper-Komplexes nicht darstellen lassen, weil die Ausbildung von sichtbaren Nebenbanden bei diesen Konzentrationsverhältnissen nicht möglich ist (32).

In der Gel-Diffusionsanordnung sind weiterhin monovalente Antikörper nicht nachweisbar. Sollten sie gegen ein Begleitprotein gebildet worden sein, so kann die Verunreinigung übersehen werden. Im übrigen sind auch bivalente Antikörper nachgewiesen worden, von denen gezeigt werden konnte, daß sie nur lösliche Komplexe bilden (30, 52). Solche Antikörper gegen Verunreinigungen sind mit den verwendeten Methoden ebenfalls nicht primär nachweisbar. Es braucht nicht besonders ausgeführt werden, daß die Aussagen über Reinheit auch der Limitierung durch die beim Kaninchen vorkommende Immuntoleranz gegen bestimmte Antigene unterliegen.

Für die Praxis der Enzymisolierung wäre es sicherlich von großem Interesse, über ein Antiserum gegen möglichst alle potentiellen Verunreinigungen zu verfügen. Man

könnte dann die Reinigungsschritte am Ergebnis immunologischer Reinheitskriterien orientieren.

Die Herstellung eines solchen Antiserums ist jedoch sicherlich nicht einfach. Die Bildung von Antikörpern ist im Einzelfall nicht nur vom Vorhandensein von Antigenen abhängig sondern von der Immunogenität ihrer determinierenden Gruppen und deren relativen Konzentrationen. Starke determinierende Gruppen können die Bildung von Antikörpern gegen schwächere unterdrücken, sodaß z.B. auch Begleitantigene nicht nachgewiesen werden könnten (29). Will man ein allgemein brauchbares Antiserum zur Erkennung von Verunreinigungen herstellen, müßte man theoretisch gegen jedes Antigen gesondert ein Antiserum erzeugen und die erhaltenen Seren poolen.

Besondere Erwähnung verdient noch eine Beobachtung im Gel-Diffusions-Test, die wir bei den Banden zwischen Schweineleber- und Schweinenierenesterase und ihren homologen Antiseren machten. Bei bestimmten Anordnungen verbreiterten sich die anfänglich schmalen und scharfen Banden und splitterten schließlich in zahllose Parallelbanden auf. Da wir dieses Phänomen nur bei Antikörperüberschuß sahen, könnte es eine Folge des "unausgeglichene Systems" (32) sein. Eine Aufsplitterung der Banden sahen wir nicht zwischen AS-Schweineleberesterase und Rinderleberesterase. Gegen das heterologe Antigen Rinderleberesterase sind im AS-Schweineleberesterase weniger Antikörper enthalten, so daß es nicht zum Antikörperüberschuß kommen kann.

Die große, variable Zahl der Banden läßt an eine periodische Präzipitation denken, wie sie von LIESEGANG bei anorganischen Verbindungen beschrieben wurde (26). Mehrere Autoren halten das nach LIESEGANG benannte Phänomen auch bei Immundiffusionsvorgängen für wahrscheinlich, wenn sich das primär entstandene Präzipitat schwer im Reagensüberschuß löst (40, 39, 50).

LOUDIN bezweifelte jedoch noch 1962 das Vorkommen der periodischen Präzipitation bei der Immundiffusion (33). Wir halten im vorliegenden Fall eine periodische Präzipitation für wahrscheinlich. Mit Hilfe der Substratfärbung mit α -Naphthylacetat konnten wir nachweisen, daß es sich bei den Parallelbanden wirklich um Enzym-Antikörper-Präzipitate handelte.

Die Tatsache, daß ein Enzym seine Aktivität auch nach Bindung mit seinen Antikörpern behält, ist bei vielen Enzymen beschrieben (14, 17, 27, 30, 34, 36, 48, 49, 51, um nur einige zu nennen). Allerdings wird in der Regel ein großer Teil der Aktivität gehemmt, und es verbleibt nur die sogenannte Residualaktivität. Ihre Höhe ist, wie be-

sonders CIANDER und Mitarbeiter zeigen konnten, stark vom Molekulargewicht des verwendeten Substrates abhängig (7, 8, 9, 10). GUNDLACH fand für das Chymotrypsin, daß der Antigen-Antikörper-Niederschlag enzymatische Aktivität nur bei Prüfung mit niedermolekularen Estern und nicht bei Verwendung von hochmolekularen Substraten wie Hämoglobin und Casein besitzt. Die Aktivität gegenüber niedermolekularen Estern war ebenfalls stark reduziert und betrug nur noch etwas über 10% der ursprünglichen Aktivität (14). Bei einigen Enzymen wird eine völlige Hemmung der Enzymaktivität beschrieben (6, 25). LANG und MASSARAT konnten z.B. bei der Untersuchung von Transaminasen nie Aktivität im Immunpräzipitat nachweisen. Das gewaschene Immunpräzipitat war bei uns noch enzymatisch aktiv. Auf Fließpapier getrocknetes Präzipitat färbte sich in kurzer Zeit braunrot mit der Substratfärbung mit α -Naphthylacetat, ebenso die Präzipitationslinien im Gel.

Bei den quantitativen Präzipitationsversuchen ergänzten sich die Aktivitäten von Präzipitat und Überstand zu ca. 100%, wenn Antiserum von nur kurz immunisierten Kaninchen eingesetzt wurde. Setzten wir das Antiserum von Tieren ein, die nach einem Jahr erneut immunisiert worden waren, so konnten im Präzipitat - im Bereich des Antikörperüberschusses - nur noch ca. 50% - 75% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden werden, ohne daß noch Aktivität im Überstand nachweisbar war (siehe Abb. 21).

Enzymkinetische Untersuchungen mit Seren langzeitimmunisierter Kaninchen könnten abklären, ob in diesen Antiseren Antikörper auftreten, die gegen aktive Zentren oder benachbarte Strukturen gerichtet sind (18). Nach Blockierung des aktiven Zentrums mit E_{600} konnte jedoch bisher kein vermindertes Absorptionsvermögen gegenüber Antikörpern gefunden werden im Vergleich zu aktivem freiem Enzym.

Die sichtbare Präzipitatbildung von Antiseren gegen Schweineleber- und Schweinenierenesterase mit dem kreuzreagierenden Antigen Rinderleberesterase war recht inkonstant. Mit AS-Schweinenierenesterase wurde häufig kein sichtbares Präzipitat erhalten. Aber auch mit AS-Schweineleberesterase nach ganz kurzer Immunisierung konnte kein sichtbares Präzipitat gefunden werden, während mit der hochempfindlichen Esteraseanfärbung die Existenz der Banden immer nachgewiesen werden konnten. Nach kurzer Immunisierungszeit treten wahrscheinlich weniger kreuzreagierende Antikörper auf. Gleichzeitig findet sich eine nicht gehemmte Enzymaktivität im Präzipitat.

MARSHALL und COHEN fanden an der Carbamylphosphatsynthetase, daß kreuz-reagierende Antikörper das Enzym stärker hemmen als die nicht kreuzreagierenden. Hier scheint eine Parallele vorzuliegen (27).

Bei weiteren Untersuchungen des Aktivitätsverhaltens des Enzyms im AG-AK-Komplex bzw. des Hemmeffektes von Antiseren sollte eine andere Versuchsanordnung gewählt werden. Es empfiehlt sich, die Antigenmenge konstant zu halten und steigende Mengen von Antiserum zuzugeben (10). Der Vorteil liegt in der anschaulicheren Aussage und in der größeren Genauigkeit im Antikörperüberschußbereich, der wegen der dort zu erwartenden größten Hemmbarkeit des Enzyms (10) besonders interessiert.

Die Frage der Identität der drei isolierten Enzyme wurde in den letzten Jahren intensiv bearbeitet (u.a. mit Aminosäureanalysen, Endgruppenbestimmung und "Finger-print"-Untersuchungen tryptischer Spaltpeptide) und an anderer Stelle berichtet (21).

Immunologische Untersuchungen erschienen lohnend, da z.T. von guten Differenzierungen berichtet wurde. An der Ribonuklease konnten die beiden Enzymformen A und B durch den Nachweis verschiedener Löslichkeit der jeweiligen Antigen-Antikörper-Komplexe unterschieden werden. Die beiden Enzyme unterscheiden sich nur durch das Fehlen oder Vorhandensein einer einzigen Carboxylgruppe (8) ! Zum anderen sollte man die Leistungsfähigkeit immunologischer Methoden auch nicht überschätzen. Besonders ist Vorsicht bei der Interpretation einer immunologischen Identitätsreaktion geboten, da z.B. mit dem Antiserum einer anderen Tierart eine Differenzierung möglich sein kann.

Aus den immunologischen Ergebnissen zum Problem der Identität bzw. immunologischen Verwandtschaft der drei Esterasen lassen sich derzeit folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Schweineleberesterase und Schweinenierenesterase zeigen im vergleichenden Doppeldiffusionsversuch nach OUCHTERLONY eine Konfluenz der Präzipitationsbanden gegen beide homologe Antiseren (Abb. 2, 4, 10). Sie sind mit Hilfe von Antiserum vom Kaninchen in dieser Anordnung nicht zu unterscheiden. Es sind keine Antikörper gegen unterschiedliche determinierende Gruppen zu finden. Aus der Konfluenz folgt, daß die beiden Enzyme mindestens eine gemeinsame determinierende Gruppe haben müssen. Die Kreuzreaktion, die zwischen der Rinderleberesterase und den beiden Schweineesterasen beobachtet wird, läßt die Mindestzahl für die determinierenden Gruppen der Schweineesterasen auf zwei ansteigen.

2. Bei den Absorptionsversuchen kann Schweineleberesterase alle Antikörper seines homologen Antiserums binden. Bei Absorption des Antiserums mit der gleichen Menge von Schweinenierenesterase ließ sich mit der Proteinfärbung zwar keine Bande gegen das Antigen mehr nachweisen. Eine Verkürzung und Verlaufänderung der Kontrollbande gegen starkes Antiserum weist jedoch auf die Existenz einer schwachen Bande hin (32).

Es empfehlen sich Wiederholungen mit Enzymmengen, die durch Titration der aktiven Zentren kontrolliert sind.

Bei Inkubation mit Rinderleberesterase konnte nur ein Teil der Antikörper aus dem AS-Schweineleberesterase entfernt werden. Im Überstand fanden sich noch reichlich Antikörper gegen Schweineleberesterase. Eine Parallelbande zum oberen Graben in Abb. 14c zeigt den Überschuß an Rinderleberesterase deutlich an. Damit hat Rinderleberesterase weniger antikörperbindende Gruppen als die Schweineesterasen. Alle drei Enzyme heben mindestens eine gemeinsame determinierende Gruppe. Die Schweineesterasen unterscheiden sich aber mindestens in einer Gruppe von der Rinderleberesterase.

3. Die Interpretation der quantitativen Präzipitationsversuche mußte gegenüber früheren Deutungen (15) nach weiteren Versuchen revidiert werden. Es hatte sich gezeigt, daß der Bezug auf Biuret-Protein beim Einsatz des Enzyms nicht optimal gewählt war, konnten doch so alle eiweißhaltigen Verunreinigungen das Ergebnis bezüglich eines unterschiedlichen Äquivalenzpunktes verfälschen. Bei Einsatz der Enzyme nach der Zahl der titrierten aktiven Zentren konnten Unterschiede im Äquivalenzbereich von Schweineleber- und Schweinenierenesterase nicht mehr gesichert werden. Es wurde deutlich, daß AS-Schweinenierenesterase immer weniger Antikörper enthielt als AS-Schweineleberesterase. Da die Immunisierungsbedingungen identisch waren, kann nicht ausgeschlossen werden, daß SNE weniger immunogen ist.

4. Rinderleberesterase einerseits und Schweinenieren- und Schweineleberesterase andererseits sind immunologisch nicht identisch. Die Präzipitationsbande von Rinderleberenzym mit AS-Schweineleberesterase zeigt Spornbildung mit benachbarten Banden von Schweinenieren- und Schweineleberesterase. Sie sind immunologisch verwandt und haben einen Teil der antikörperbindenden Gruppen (Epitope) gemeinsam, mindestens jedoch eine Gruppierung.

Es ist unklar, wie der gefundene quantitative Unterschied zwischen den Antiseren beider Schweineesterasen gedeutet werden kann. Auf einen Unterschied der zu prüfenden Proteine zu schließen, erscheint jedoch bei der komplexen Natur der Antikörperbildung primär nicht möglich.

Die stöchiometrischen Untersuchungen, die insbesondere die molekularen Bindungsverhältnisse von Antigen und Antikörper bei den verschiedenen Enzym-Antienzym-Systemen abklären sollen, stehen erst am Anfang. Mit ihrer Hilfe wird es möglich sein, unter bestimmten Voraussetzungen die Zahl der Antikörper im Antiserum überschlagmäßig zu ermitteln und eventuell auch ihre Abnahme bei Absorption an kreuzreagierende Antigene zu schätzen. Gesicherte Ergebnisse konnten bislang nicht erhalten werden. Zu nennen ist vielleicht, daß sich im Äquivalenzbereich etwa 4 bis 5 Antikörper mit einem Molekül Schweineesterase verbinden. Bei Untersuchungen an Ribonuklease (47) ergab sich ein Verhältnis von maximal 4 Antikörpern pro Antigenmolekül, beim Serumalbumin 7 zu 1 (45) und beim Eialbumin 5 zu 1 (46). Für den Antikörperüberschuß ergeben sich bei uns deutlich höhere Zahlenverhältnisse (Tabelle I). Auf anderem Weg fand GUNDLACH (13), daß im Diisopropylfluorophosphat-Chymotrypsin mindestens und wahrscheinlich auch maximal 5 verschiedene die Antigen-Antikörper-Reaktion determinierende Gruppen vorhanden sind. Bei Einsatz von Esterasen weiterer Tierarten (1) wäre es wohl auch bei der Schweineesterase möglich, die Zahl der immunogenen Gruppen annähernd zu bestimmen.

Die Frage nach immunologischer Identität von Esterasen aus verschiedenen Organen hat sich schon häufig gestellt. In Gewebsextrakten von Ratten war eine der Esterasen in mehreren Geweben (Milz, Leber, Leukocyten) immunologisch identisch (3). In Nierenhomogenaten wurden beim Menschen Esterasen gefunden, die auch im Harn auftraten und immunologisch nicht zu unterscheiden waren (17). Auch sie ließen sich in Leukocyten, Lymphocyten sowie in Leber und Milz beim Menschen nachweisen. Ihre Unterscheidung und Untersuchung könnte unter Umständen auch klinisch relevant sein.

RAPP unterschied unter 5 Carboxyl-Esterasen in Extrakten von Fundusschleimhaut beim Menschen eine, die zur Bindung von Vitamin B12 fähig ist (37).

Die Untersuchung von immunologischer Identität stößt auf Schwierigkeiten, die prinzipieller Natur sind. Die Antikörperbildung ist ein sehr komplexes und vielschichtiges

Problem. Die Immunantwort eines Tieres auf angebotene immunogene Determinanten ist außerordentlich stark von deren immunogener Qualität und davon abhängig, welche andere Gruppierungen gleichzeitig angeboten werden. Stark immunogene Determinanten können die Antikörperbildung so einseitig in ihre Richtung lenken, daß schwächere überspielt werden. Die nicht dominierenden können jedoch gerade die spezifischeren sein. Selbst wenn man davon ausgeht, daß ein absolut reines Antigen zur Immunisierung verwendet wurde, ist nicht gewährleistet, daß sich tatsächlich "spezifische" Antikörper ausbilden. Dabei sind unter spezifischen Antikörpern die gemeint, die möglichst mit keinem anderen Antigen des Wirtstieres reagieren. Will man die Frage nach Identität zweier Antigene optimal beantworten, muß der Weg zum spezifischen Antikörper gesucht werden. Solange sie nicht vorliegen, hat zwar ein gefundener Unterschied Gültigkeit, eine Identitätsreaktion ist jedoch immer mit Vorbehalt aufzunehmen (32, 35, 53).

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über immunchemische Untersuchungen (Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY, Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER, quantitative Präzipitationsversuche und Absorptionsversuche) von drei hochgereinigten Carboxylesterasen (EC 3.1.1.1) aus Schweineleber, Schweineniere und Rinderleber berichtet. Die Antiseren wurden von Kaninchen erhalten.

Es wird gezeigt, daß selbst hochgereinigte Präparationen noch Spuren von Fremdkomponenten enthalten, die nur immunologisch nachweisbar sind.

Schweineleber- und Schweinenierenesterasen sind in der Immunelektrophorese und im Doppeldiffusionstest nicht zu unterscheiden. Bei Doppeldiffusionsversuchen tritt bei beiden Antigenen das LIESEGANG'sche Phänomen (periodische Präzipitation) auf.

Die Rinderleberesterase wandert in der Immunelektrophorese bei pH 8,2 kathodisch, die Schweineesterasen dagegen anodisch. Aus den Doppeldiffusions- und Absorptionsversuchen geht hervor, daß die Rinderleberesterase mit den Schweineesterasen nicht immunologisch identisch aber verwandt ist.

Die Schweineesterasen sind auch mit Hilfe von quantitativen Präzipitationsversuchen nicht sicher zu unterscheiden. Immunisierung von Kaninchen mit Schweinenierenesterase führt regelmäßig zu deutlich geringeren Antikörpertitern.

Die AG-AK-Präzipitate sind gegen α -Naphthylacetat enzymatisch aktiv. Dies ermöglicht einfache stöchiometrische Untersuchungen zur Frage des Bindungsverhältnisses von Antigen zu Antikörper. Der Quotient AG/AK zeigt bei doppelt-logarithmischer Auftragung gegen die Antigenkonzentration einen linearen Verlauf im Bereich des Antikörperüberschusses bis zum Äquivalenzbereich.

Wurden die Kaninchen nur kurze Zeit immunisiert und nur einmal "geboostert", ist die Aktivität des Enzyms im Präzipitat gleich der des freien Enzyms. Die Aktivitäten im Trübungsansatz entsprechen den eingesetzten und steigen auch oberhalb des Äquivalenzpunktes, d.h. im Antigenüberschuß, weiter linear an. Wurde lange Zeit immunisiert und mehrfach "geboostert", lassen sich jedoch nur noch etwa 50 bis 75% der eingesetzten Aktivität der Schweineesterasen gegenüber α -Nitrophenylacetat im Bereich des Antikörperüberschusses nachweisen.

LITERATURVERZEICHNIS

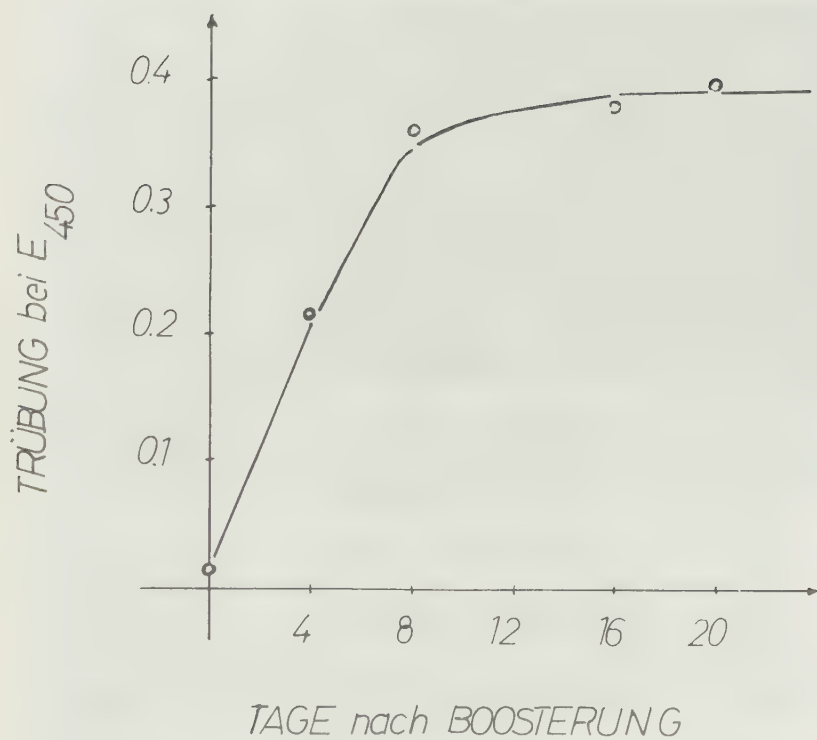
1. ARNDT, R. und K. KRISCH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 589-598 (1972)
2. BACKHAUSZ, R., Immunodiffusion und Immunelektrophorese, Gustav Fischer, Jena (1967)
3. BEERNINK, D., J. COURON et P. GRABAR, zitiert in: 15. Mosbacher Kolloquium, Ges. f. physiol. Chemie, Immunchemie Hrsg. O. Westphal, Springer, Berlin (1965)
4. BENÖHR, H.C. und K. KRISCH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 1102-1115 (1967)
5. BOGUTH, W., K. KRISCH und H. NIEMANN, Biochem. Z. 341, 149 (1965)
6. BOLLET, J., J.S. DAVIS, ETH, M.D. and J.O. HURT, J. exp. Med. 116, 109 (1962)
7. CIANDER, B., Nature, 188, 619-622 (1960)
8. CIANDER, B., Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 495 (1963)
9. CIANDER, B., Antibodies to biologically active molecules ed. B. Ciander, pp. 85-137, Pergamon Press, Oxford (1967)
10. CIANDER, B., Enzyme Immunologie Behringwerk-Mitteilungen 47, 16-34 (1967)
11. FRANZ, W. und K. KRISCH, Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 816 (1966)
12. FRANZ, W. und K. KRISCH, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 575-587 (1968)
13. GUNDLACH, G., Habilitationsschrift, Med. Fakultät Würzburg (1964)
14. GUNDLACH, G., 15. Mosbacher Kolloquium, Immunchemie, Hrsg. O. Westphal, Springer, Berlin (1965)
15. HAIN, P. und K. KRISCH, Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 313-318 (1968)

16. HEIDELBERGER, M. and F.E. KENDALL, J. exp. Med. 62, 697 (1935)
17. HERMANN, G., Behringwerke-Mitteilungen 47, 45-58 (1967)
18. HEYMANN, E. und K. KRISCH, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 609 (1967)
19. HOLLUNGER, G., Acta pharmacol. et toxicol. 17, 374 (1960)
20. KABAT, E.A. and M. MAYER, Experimental Immunochemistry Charles C. Thomas, Springfield/III. (1961)
21. KLAPP, B., K. KRISCH und BORNER, K., Z. physiol. Chem. 351, 81 (1970)
22. KRISCH, K., Biochem. Z. 337, 531 (1963)
23. KRISCH, K., Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 122, 265 (1966)
24. KRISCH, K., PAHLICH, E. und BORNER, K., Biochem. Z. 350, 173-182 (1969)
25. LANG, N. and S. MASSARAT, 15. Mosbacher Kolloquium, Immunchemie, Hrsg. O. Westphal, Springer, Berlin (1965)
26. LIESEGANG, E.R., Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden Abt. 3, Teil B, 33. Urban und Schwarzenberg, Berlin (1929)
27. MARSHALL, M. and P.P. COHEN, J. biol. Chem. 236, 718 (1961)
28. MEYER-ARENDT, E. und PFLEIDERER, G., Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
29. MÜLLER-RUCHHOLZ, W., pers. Mitteilung
30. NACE, G.W., Ann. N.Y.Acad. Sci. 103, 981-988 (1963)
31. OUCHTERLONY, Ö., ARK. Kem., Mineralog., Ser. B 26, 1 (1948)
32. OUCHTERLONY, Ö., 15. Mosbacher Kolloquium, Immunchemie, Herausg. O. Westphal, Springer, Berlin (1965)
33. OUDIN, J., Allergology (Ed. by BROWN, E.A.) 319, Pergamon Press (1962)

ANHANG :

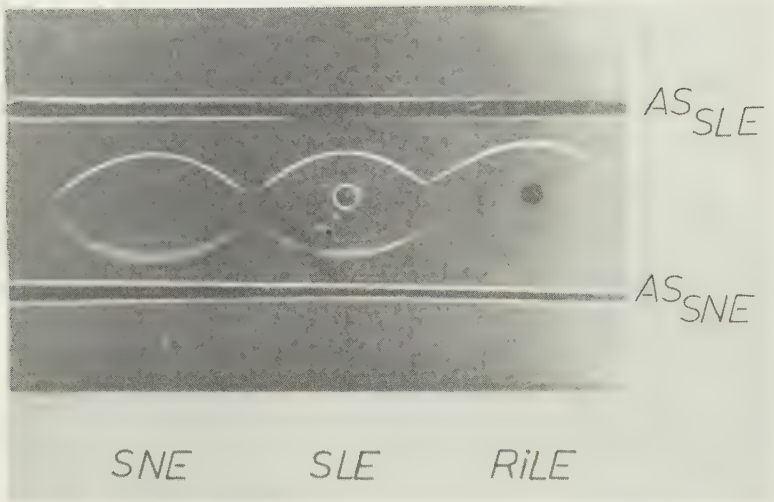
ABBILDUNGEN UND TABELLE

Abb. 1



Titeranstieg eines vor einem Jahr mit Schweineleberesterase immunisierten Kaninchens nach Boosterung

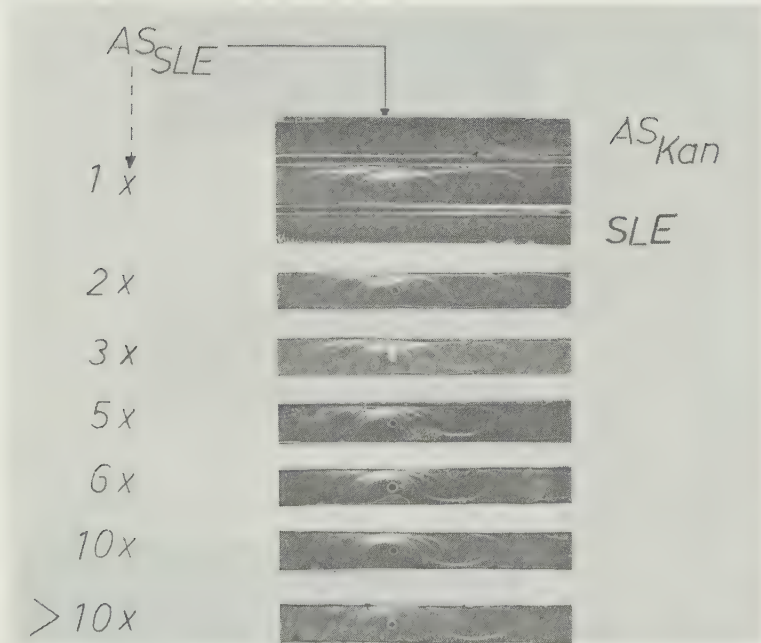
Abb. 2



Vergleichende radiale-lineare Doppeldiffusion von Schweinenieren- (SNE), Schweineleber- (SLE) und Rinderleberesterase ($RILE$) gegen AS -Schweineleberesterase (AS_{SLE}) im oberen Graben und AS -Schweinenierenesterase (AS_{SNE}) im unteren Graben.

Die Proteinkonzentration der Enzyme beträgt 1 mg/ml.

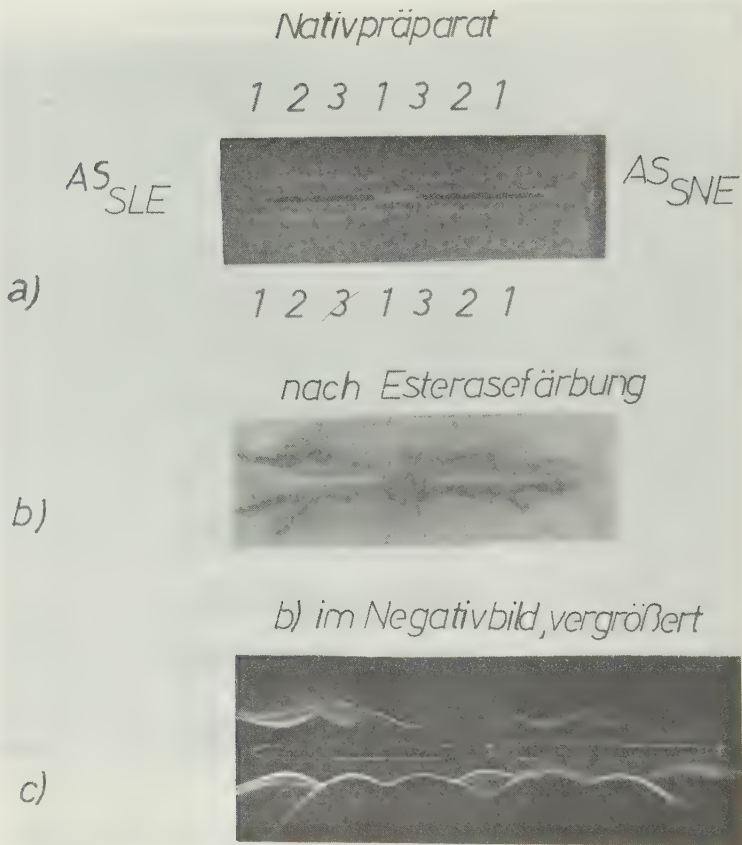
Abb. 3



Zuordnung der Antikörper in AS-Schweineleberesterase (AS_{SLE}) zu den γ G-Globulinen innerhalb der Serumproteine des Kaninchens.

Im oberen Graben findet sich Antiserum vom Esel gegen Kaninchenserum (AS_{Kan}), im unteren Schweineleberesterase (SLE) 0,12 mg/ml.

In den sechs unteren Präparaten steigt die Konzentration von AS-Schweineleberesterase bis auf über das Zehnfache an, die Gräben sind nicht dargestellt.



Aufdecken einer nicht primär sichtbaren Bande zwischen Rinderleberesterase (1) und AS_{SNE} durch spezifische Substratfärbung.

Als Vergleich dienen die Banden der Enzyme mit AS_{SLE} .

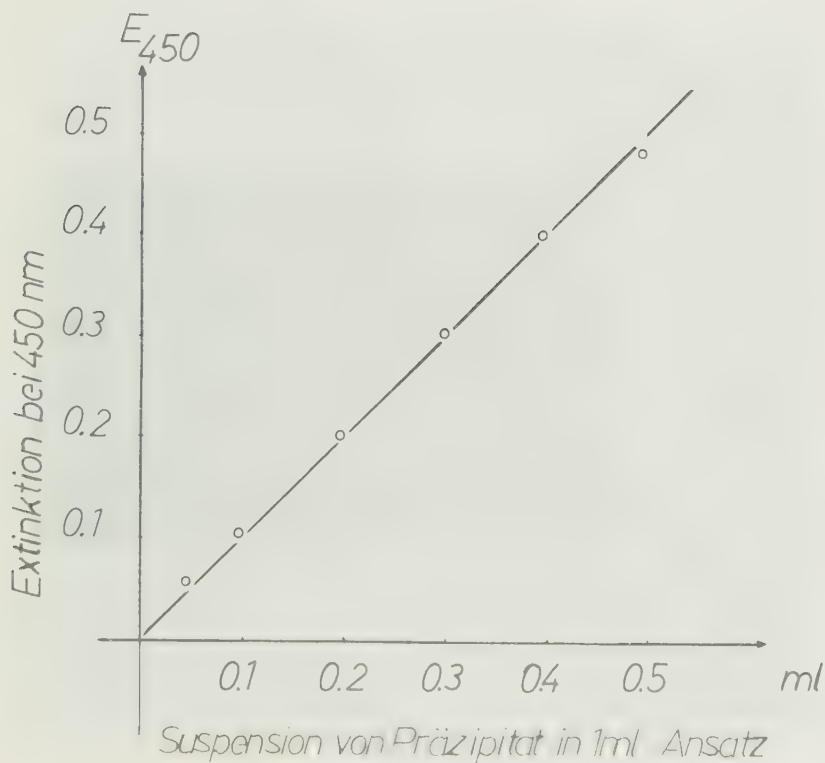
1 = Rinderleberesterase

2 = Schweineleberesterase

3 = Schweinenierenesterase

Proteinkonzentration der Enzyme : 1 mg/ml

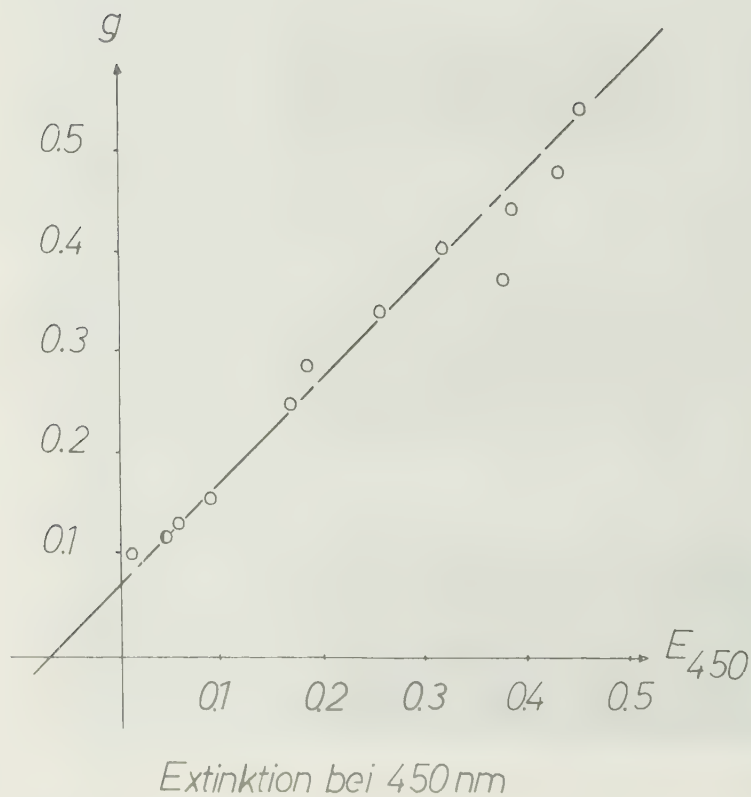
Abb. 5



Quantitative Bestimmung des Immunpräzipitates durch Trübungsmessung bei 450 nm im Spektralphotometer

Linearer Anstieg der Extinktion, wenn die Präzipitat-Suspension im Ansatz anteilmäßig zunimmt.

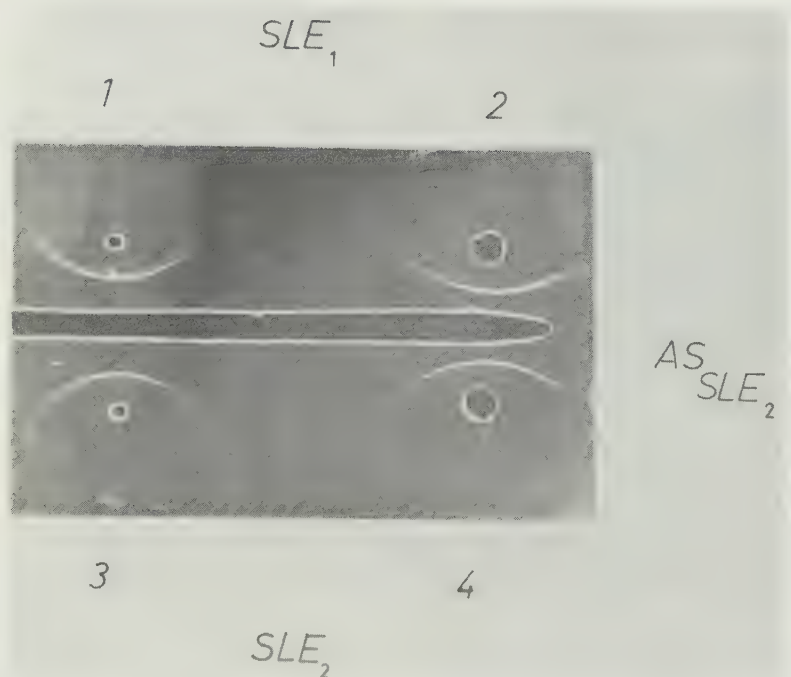
Abb. 6



Quantitative Bestimmung des Immunpräzipitates

Vergleich der Protein-Mengen (Mikrobiuret) mit den Werten der Trübungsmessung bei 450 nm und beschriebenem Ansatz.

Abl. 7

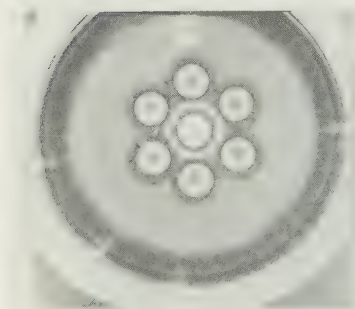


Radiale-lineare Doppeldiffusion auf Objektträgern mit den beiden Schweineleberesterase-Präparationen SLE_1 (1 und 2) und SLE_2 (3 und 4) gegen Antiserum der zweiten Präparation (AS_{SLE_2}).

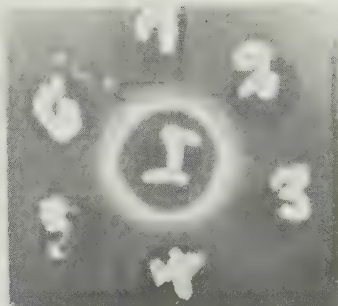
Durch die kleineren Antigenbehälter bei 1 und 3 kommt eine geringere Menge an Antigen zum Einsatz.

Die Konzentration der Enzyme beträgt 1 mg/ml.

radiale Doppeldiffusion



nach 12 Stunden



nach 2 1/2 Tagen

Diffusionszeit

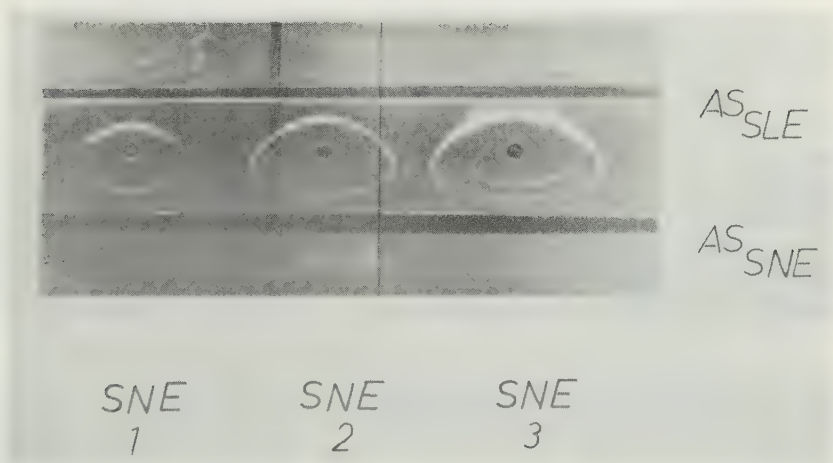
Radiale Doppeldiffusion von Schweineleberesterase (SLE) gegen ihr Antiserum (AS_{SLE}) nach verschiedenen Diffusionszeiten.

Die kreisförmigen Nebenbanden sind nicht esteraseaktiv und auf Verunreinigungen zurückzuführen. Sie entwickeln sich erst nach längeren Diffusionszeiten.

In den peripheren Ausstanzungen : SLE

In der zentralen Ausstanzung : AS_{SLE}

Abb. 9



Nachweis von Verunreinigungen in Schweinenierenesterase durch den Einsatz von konzentrierteren Enzymlösungen im Doppeldiffusionsversuch.

Bei ansteigender Konzentration von SNE werden die Hauptbanden gegen den unteren Graben schwächer und zerfließen, während die Nebenbanden deutlicher hervortreten. Bei SNE 3 kommt eine zweite Verunreinigungsbande nahe am Antigenbehälter zum Vorschein.

SNE 1 = Schweinenierenesterase 1,0 mg/ml

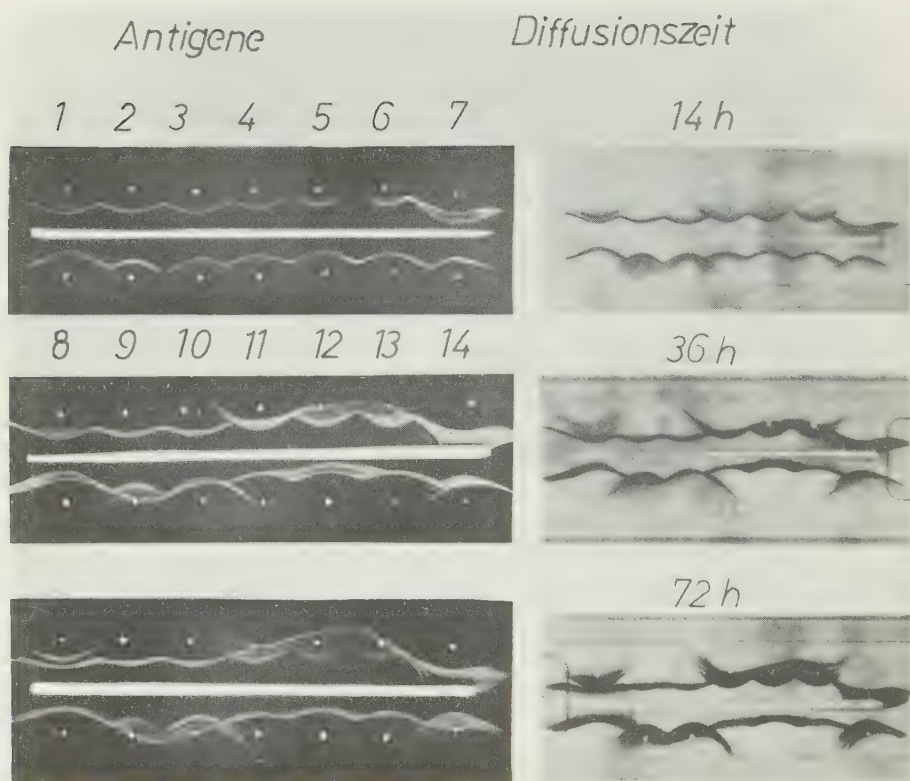
SNE 2 = Schweinenierenesterase 1,8 mg/ml

SNE 3 = Schweinenierenesterase 2,7 mg/ml nach Umfällung

AS_{SLE} = Antiserum gegen Schweineleberesterase im oberen Graben (100 mg/ml)

AS_{SNE} = Antiserum gegen Schweinenierenesterase im unteren Graben, fünffach konzentriert (500 mg/ml)

Abb. 10



Präzipitation verschiedener Schweineleber- (SLE), Schweinenieren- (SNE) und Rinderleberesterasen (RiLE) mit AS_{SLE} nach Esterasefärbung.

Verstärkte Ausbildung von Parallelbänden bei Zunahme der Diffusionszeiten besonders bei den Antigenen 4, 5, 6, 8, 9 und 14.

SLE = 4, 10, 14

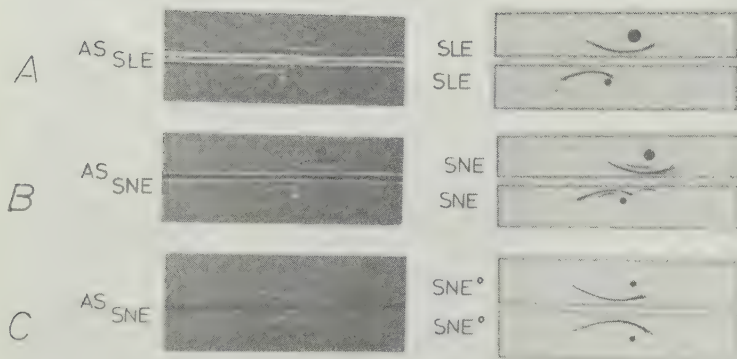
SNE = 5, 6, 9

RiLE = 1, 2, 3, 7, 8, 11, 12, 13

AS_{SLE} = Antiserum gegen Schweineleberesterase

Die Antigenbehälter sind besonders klein gewählt, um Antikörperüberschuß zu provozieren. Die ungewöhnlichen Banden von RiLE in 1 fanden sich nur bei dieser einen Präparation, sie sind zweifelhaft.

Abb. 11



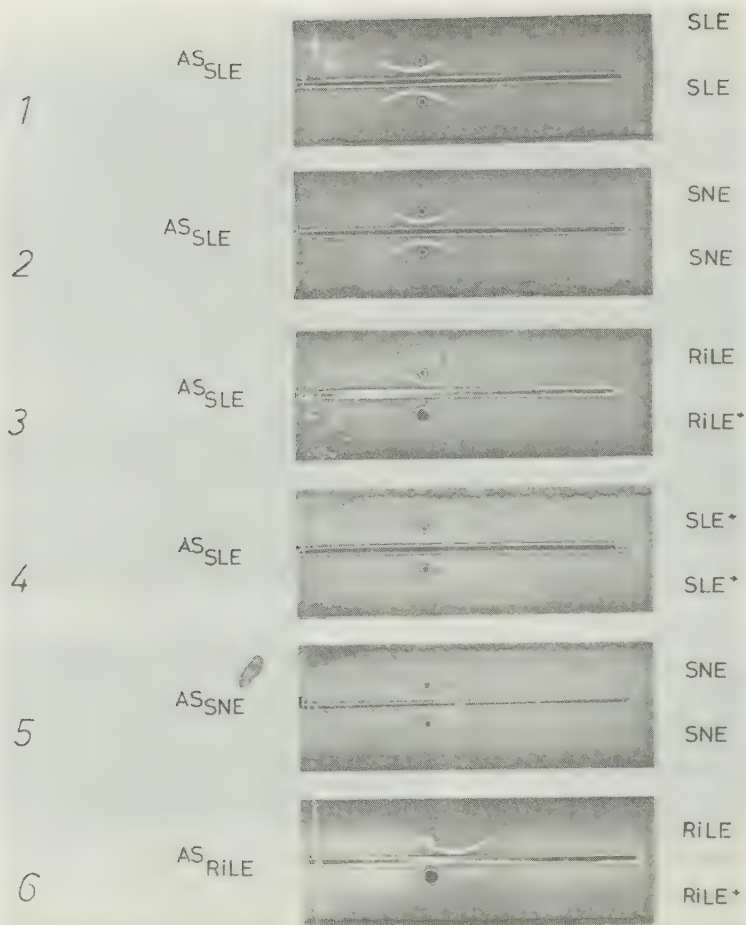
Immunelektrophorese von Schweineleberesterase (SLE) und Schweinenierenesterase (SNE)

Anode links, Kathode rechts, AS – Antiserum im Graben SNE^o – Schweinenierenesterase nach weiterer Reinigung durch Rechromatographie und Ammonsulfatfällung

Die obere und untere Hälfte der beiden Objektträger A und B unterscheiden sich in der Größe des Antigenloches, wobei im oberen Teil das jeweils 5fache Volumen eingipettiert wurde. Obere und untere Hälfte in C sind identisch.

Der besseren Übersicht halber ist im rechten Teil der Abbildung eine schematische Zeichnung der Präzipitationslinien wiedergegeben.

Abb. 12

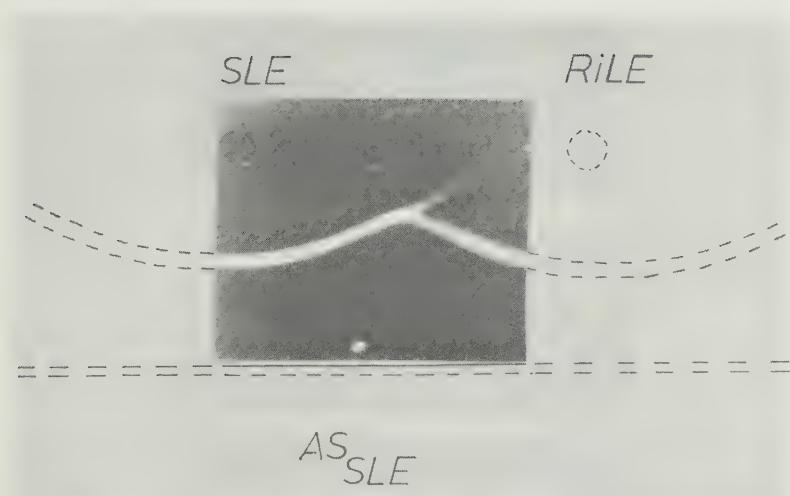


Immunelektrophorese von Schweineleberesterase (SLE), Schweinenierenesterase (SNE), Rinderleberesterase (RiLE) und einer Schweineleberesterase-Präparation aus Aceton-trockenpulver (SLE⁺).

RiLE⁺ = Rinderleberesterase nach weiterer Reinigung durch Rechromatographie und Ammonsulfatfällung. Die Antigenbehälter (3 und 6 unten) enthalten etwa das 5fache der oberen Behälter.

Anode links, Kathode rechts, AS = Antiserum im Graben.

Abb. 13

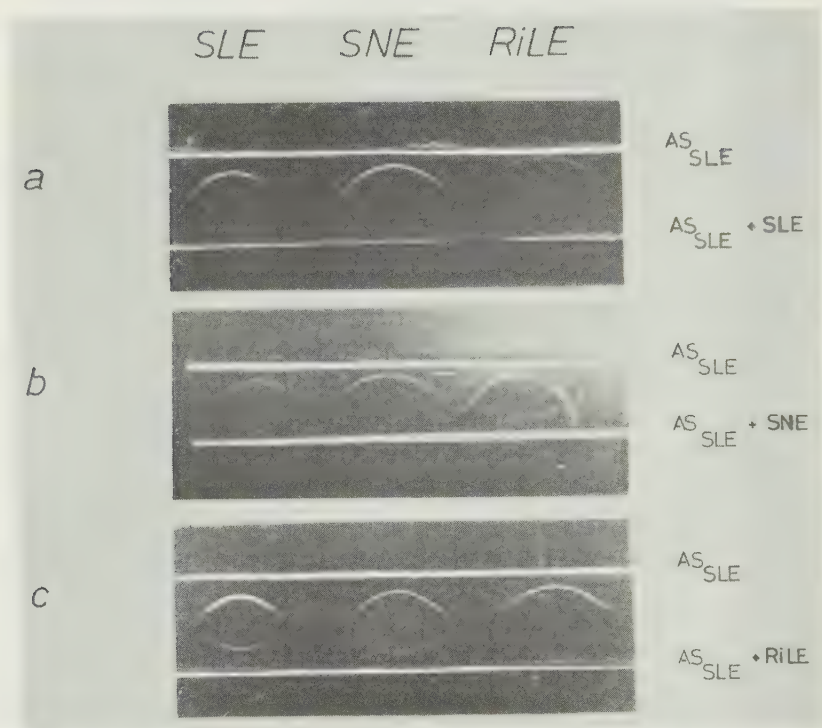


Spornbildung zwischen den Banden von Schweineleberesterase (SLE) und Rinderleberesterase (RiLE) mit Antiserum gegen Schweineleberesterase (AS_{SLE}) bei radialer-linearer Doppeldiffusion.

Nach einer "Teilkonfluenz" bei Berührung der beiden Banden läuft die Bande der Schweineleberesterase abgeschwächt weiter. Es liegt partielle Antigengemeinschaft vor.

Der weitere Verlauf der Banden ist gestrichelt dargestellt. Das Antiserum findet sich in dem linearen Graben unterhalb des Bildes.

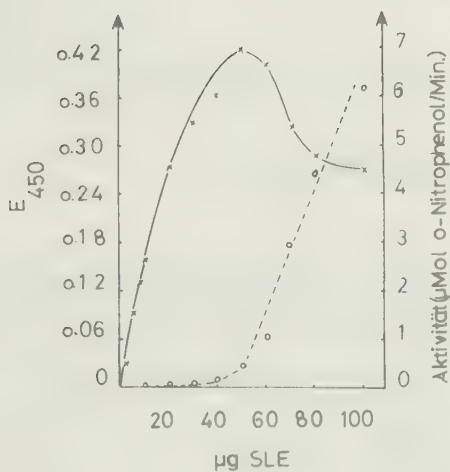
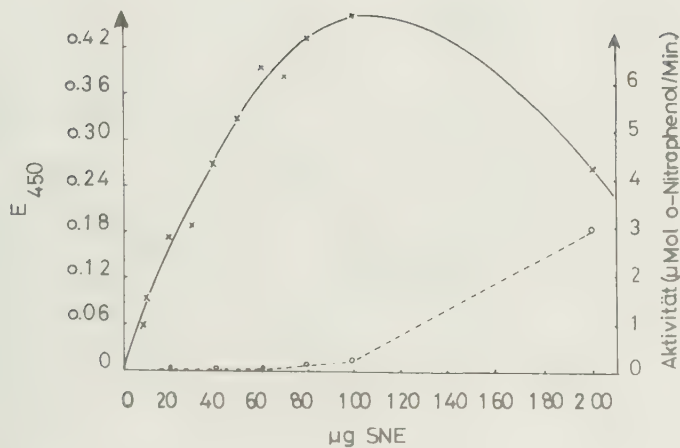
Abb. 14



Radiale-lineare Doppeldiffusion von Schweineleberesterase (SLE), Schweinenierenesterase (SNE) und Rinderleberesterase (RiLE) gegen natives Antiserum gegen Schweineleberesterase (AS_{SLE}) (oberer Graben) und gegen das gleiche Antiserum, das mit einem Überschuß eines der drei Enzyme vorinkubiert wurde (unterer Graben).

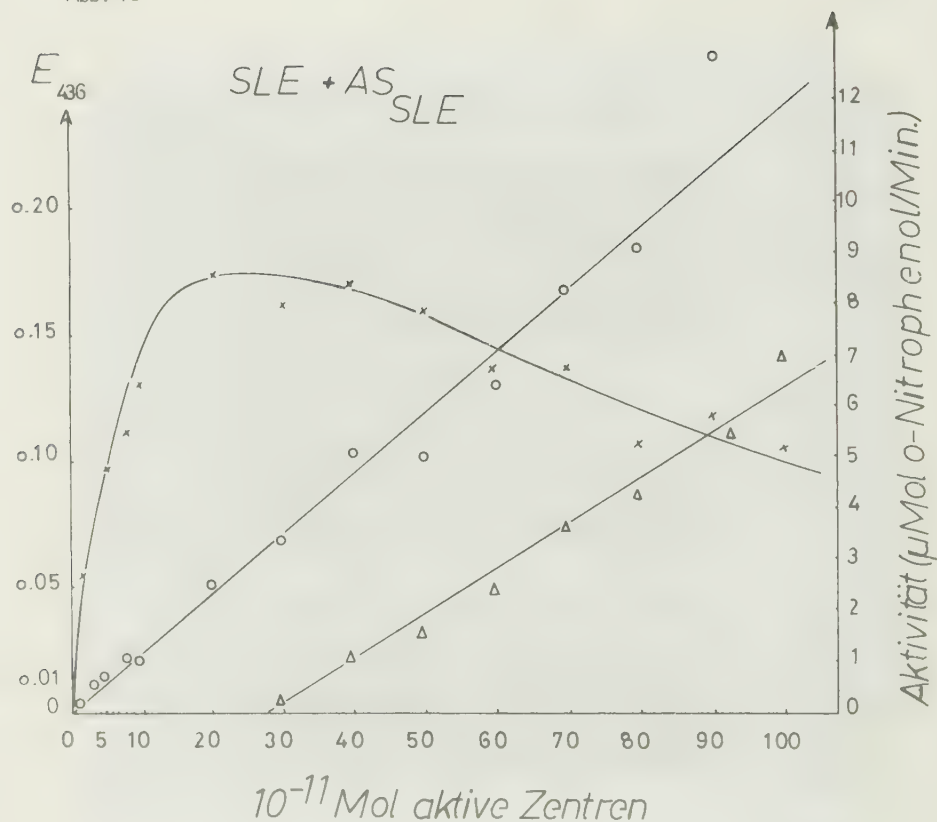
Gegen den unteren Graben ist in *a* keine Bande ausgebildet, in *b* ist eine schwache Bande bei SLE zu diskutieren (siehe Text), die Banden von SLE und SNE sind in *c* deutlich abgeschwächt, die Bande parallel zu den Gräben ist auf den relativ starken Antigenüberschuß nach der Inkubation zurückzuführen.

Abb. 15



Quantitative Bestimmung der Präzipitatbildung (x - x) und der Esteraseaktivität im Überstand (o - o) in Abhängigkeit von der Antigenmenge (Schweineierenesterase oben, Schweineleberesterase unten). Die Antikörpermenge (AS-Schweineleberenzym) wurde konstant gehalten. Ansatzvolumen 1,2 ml.

Abb. 16

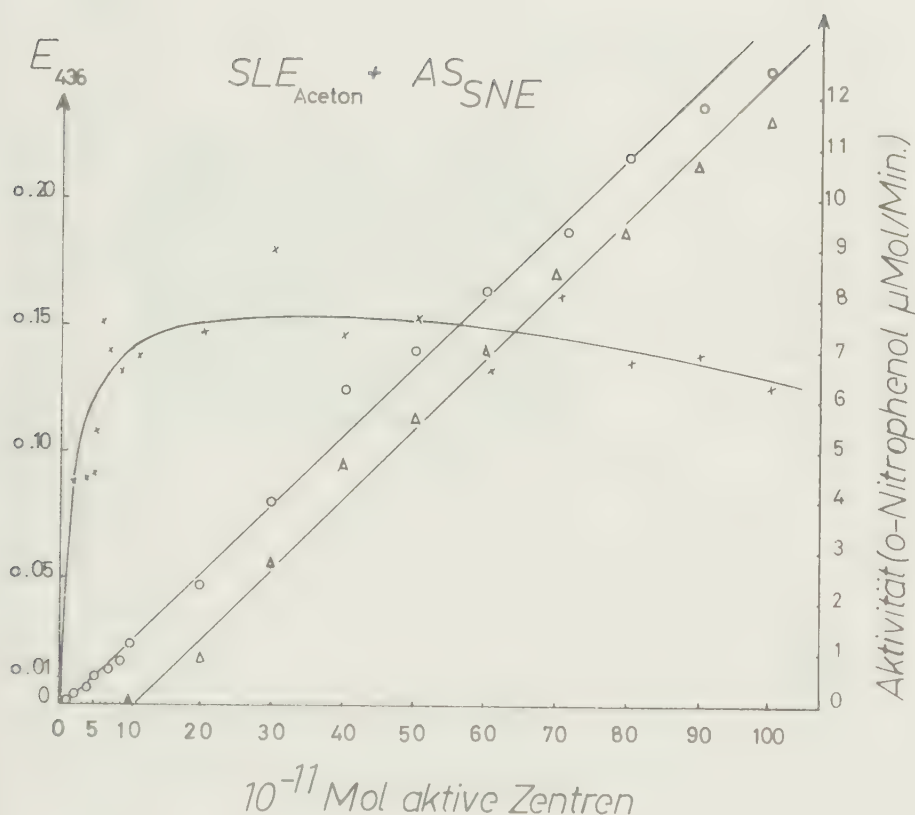


Quantitative Bestimmung der Präzipitatbildung (x - x), der Esteraseaktivität im Trübungsansatz (o - o) und der Esteraseaktivität im Überstand (Δ - Δ) in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Schweineleberesterase (SLE).

Die Enzymmenge ist in Mol aktive Zentren angegeben. 10^{-11} Mol aktive Zentren entsprechen 1,09 μ g Protein Schweineleberesterase.

Das Antiserum gegen Schweineleberesterase (AS_{SLE}) ist konstant.

Abb. 17

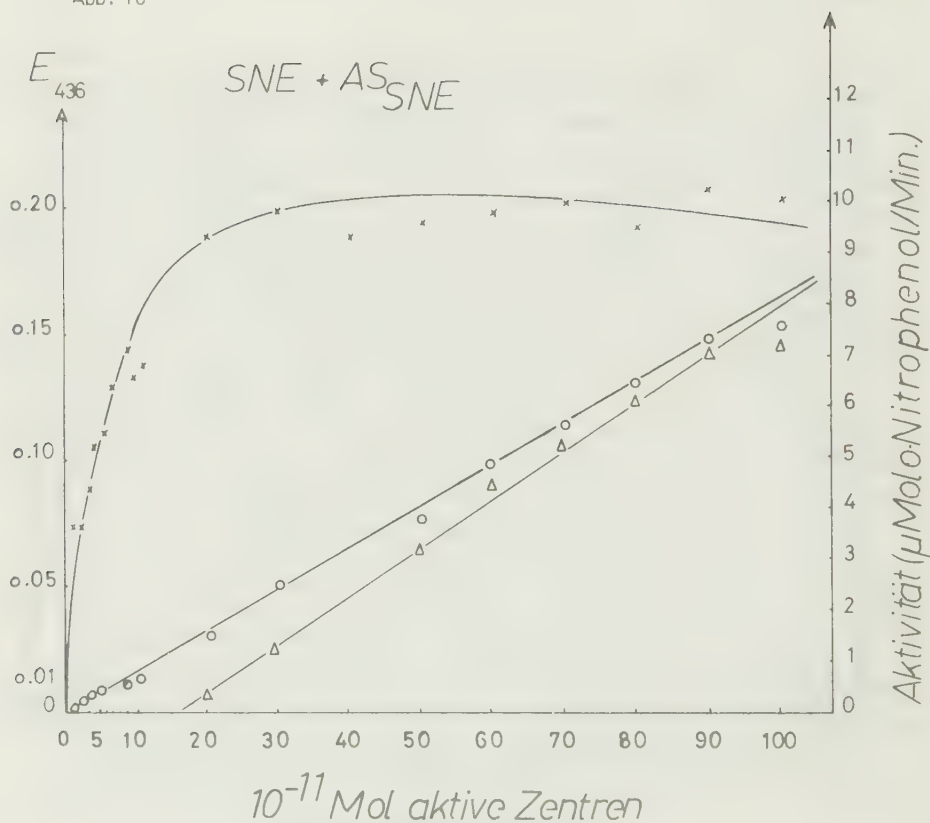


Quantitative Bestimmung der Präzipitatbildung ($x - x$), der Esteraseaktivität im Trübungsansatz ($o - o$) und der Esteraseaktivität im Überstand ($\Delta - \Delta$) in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Schweineleberesterase. Dieser Aufschluß wurde in den ersten Schritten mit Aceton behandelt (SLE_{Aceton}).

Die Enzymmenge ist in Mol aktive Zentren angegeben. 10^{-11} Mol aktive Zentren entsprechen $1,1 \mu$ g Protein Schweineleberesterase.

Das Antiserum gegen Schweineleberesterase ist konstant (AS_{SNE}).

Abb. 18

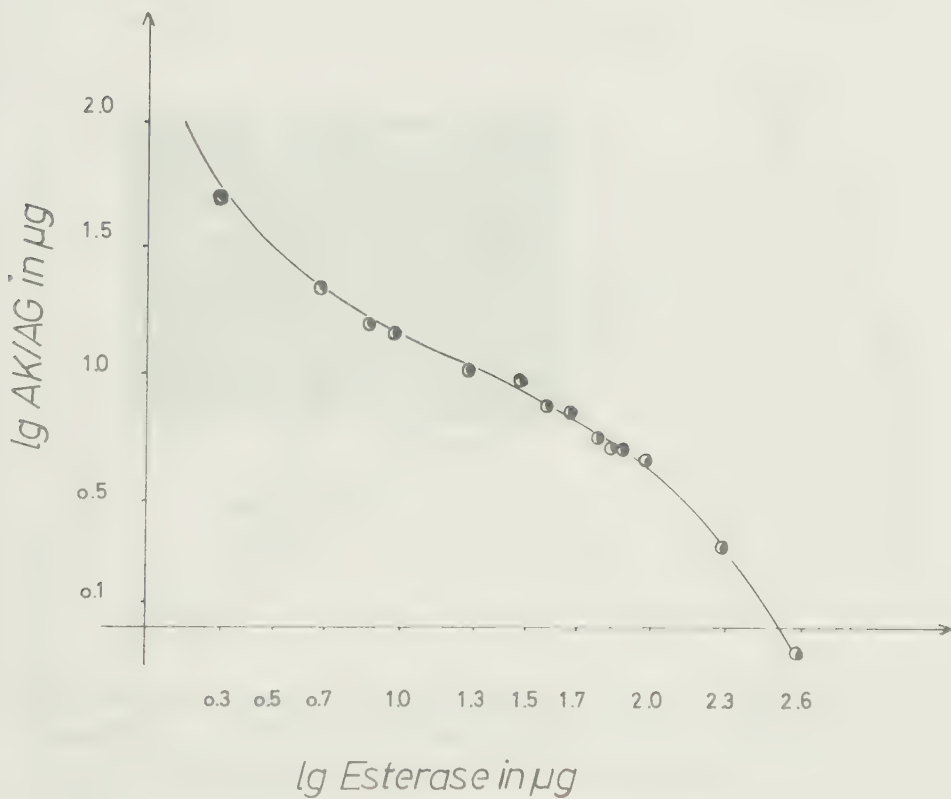


Quantitative Bestimmung der Präzipitation ($x - x$), der Esteraseaktivität im Trübungsansatz ($o - o$) und der Esteraseaktivität im Überstand ($\Delta - \Delta$) in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Schweinenierenesterase (SNE).

Die Enzymmenge ist in Mol aktive Zentren angegeben. 10^{-11} Mol aktive Zentren entsprechen $1,45 \mu g$ Protein Schweinenierenesterase (SNE).

Das Antiserum gegen Schweinenierenesterase (AS_{SNE}) ist konstant.

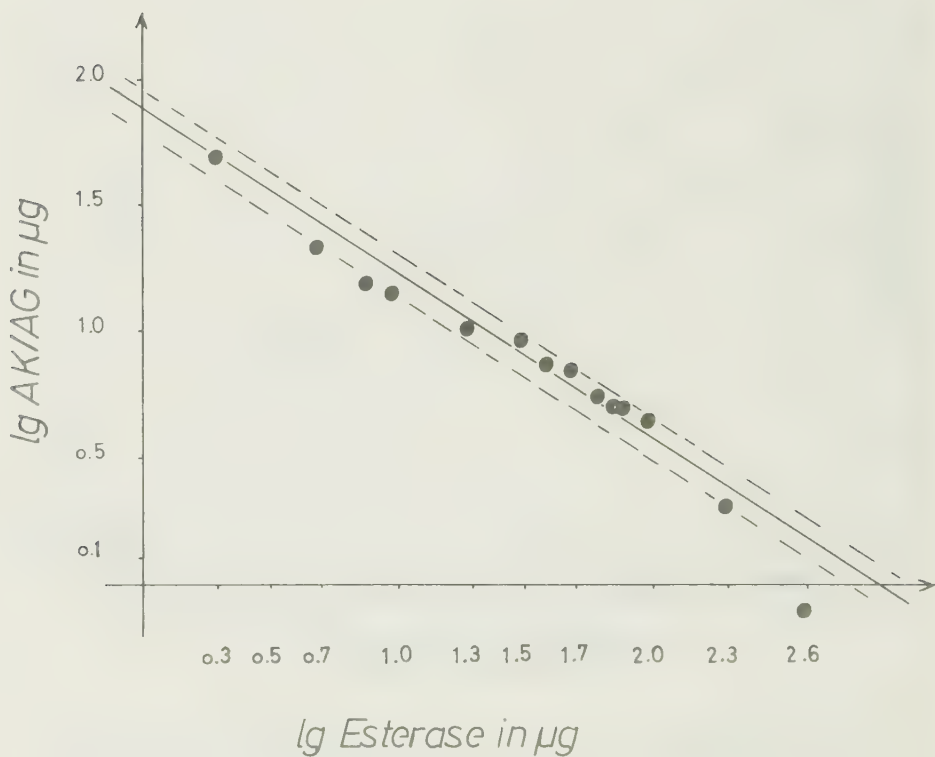
Abb. 19 A



Beziehung von eingesetztem Enzym und gefundenem Antigen-Antikörper-Verhältnis in doppelt logarithmischer Auftragung.

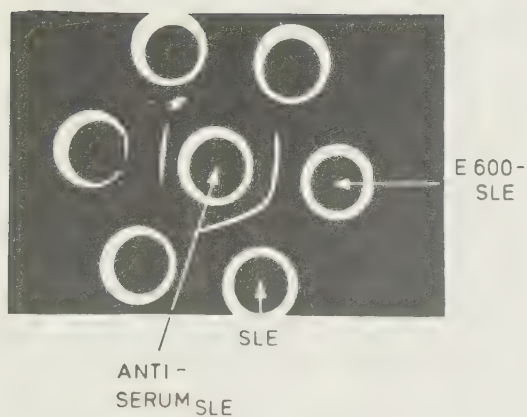
Die dargestellte Kurve ergibt sich, wenn man die erhaltenen Punkte kontinuierlich verbindet.

Abb. 19 B



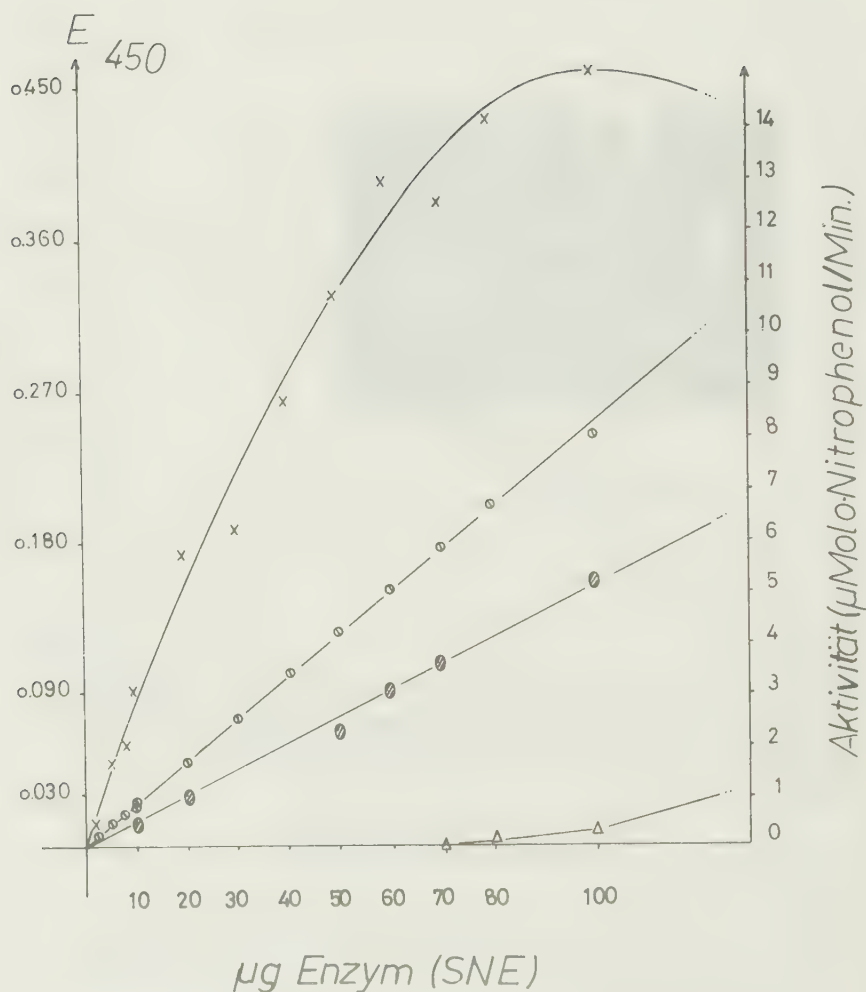
Doppelt logarithmische Auftragung der Abhängigkeit von eingesetztem Enzym und gefundenem Antigen-Antikörper-Verhältnis. Es erscheint möglich, eine lineare Beziehung der aufgetragenen Werte anzunehmen. Die gestrichelten Geraden geben den Streubereich an.

Abb. 20



Präzipitation von nativer Schweineleberesterase (SLE) und von Enzym, das mit E 600 vorbehandelt wurde (E 600-SLE), mit Antiserum gegen das native Enzym (ANTISERUM_{SLE}). Die Banden des vorbehandelten und des nativen Enzyms unterscheiden sich nicht voneinander.

Abb. 21



Quantitative Bestimmung der Präzipitatbildung (x - x), der eingesetzten Esteraseaktivität (o - o), der Esteraseaktivität im Präzipitat (Ø - Ø) und der des Überstandes (Δ - Δ) in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Schweineleberesterase (SNE).

Das Antiserum gegen Schweineleberesterase ist konstant.

Im Präzipitat findet sich nach Langzeitimmunisierung nur ca. 1/2 bis 2/3 der eingesetzten Aktivität wieder.

Tabelle I Wertetabelle für die doppelt logarithmische Auftragung der Abhängigkeit von eingesetztem Enzym und gefundenem Antigen-Antikörper-Verhältnis

eingesetztes Enzym in µg	2	5	8	10	20	30	40	50	60	70	80	100	200	400
Proteingehalt des Präzipitates in µg	101	116	133	156	250	292	342	403	387	437	472	539	488	342
Enzym im Überstand in µg	-	-	-	-	0.7	1.7	-	0.6	13	0.9	1.4	2.6	3.6	208
Enzymgehalt des Präzipitates in µg Protein	2	5	8	10	19.3	28.3	40	49.4	58.7	69.1	78.6	97.4	163.4	192
Protein der AK im Präzipitat in µg	99	111	125	146	230.7	263.7	302	353.6	328.3	368	393.4	441.6	324.6	150
Quotient AK/AG - Protein in µg	4.95	22	155	14.5	12.3	9.3	7.5	7.2	5.6	5.3	5	4.5	2	0.78
lg des Quotienten	1.69	1.34	1.19	1.16	1.08	0.97	0.88	0.85	0.75	0.72	0.7	0.65	0.3	- 0.11
lg des eingesetzten Enzyms in µg	0.3	0.7	0.9	1	1.3	1.5	1.6	1.7	1.8	1.85	1.9	2	2.3	2.6

Für die Überlassung der Arbeit
und die freundliche Unterstützung,
die mir jederzeit gewährt wurde,
möchte ich Herrn Professor Dr. K. Krisch
recht herzlich danken.

Wertvolle Anregungen verdanke ich
Herrn Prof. Dr. Dr. W. Müller-Ruchholz.

Frau Dr. Gröschel-Stewart, Frankfurt,
sowie den Behring-Werken, Marburg/Lahn,
bin ich für die Einarbeitung in die immuno-
logische Methodik zu Dank verpflichtet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft
danke ich für die großzügige Unterstützung
der Arbeit durch Sachbeihilfen.

LEBENS LAUF

Am 22.04.41 wurde ich als drittes von sechs Kindern des evangelisch-freikirchlichen Kaufmanns Bruno Hain und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Schönknecht, in Litzmannstadt/Polen, geboren.

1945 flohen wir nach Westdeutschland und wohnten in verschiedenen Bundesländern, zuletzt in Nordrhein-Westfalen, wo ich am 16. März 1961 am Jung-Stilling-Gymnasium in Hilchenbach das Abitur bestand. Nach zweijähriger Dienstzeit in der Bundeswehr wurde ich als Leutnant der Reserve entlassen und begann an der Friedrich Alexander-Universität in Erlangen das Medizinstudium. Ab dem 7. Semester studierte ich an der Justus-Liebig-Universität in Gießen und legte am 31.01.69 das medizinische Staatsexamen ab. Nach der Medizinalassistentenzeit wurde mir am 25.11.1970 die Approbation erteilt. Seit Februar 1972 bin ich wissenschaftlicher Angestellter des Institutes für Medizinische Statistik und Dokumentation der Universität Gießen und an der II. Med. Klinik der Universität Mainz tätig.

Seit dem 04.03.69 bin ich verheiratet mit meiner Frau Gudrun, geb. Masthoff. Unser Sohn, Andreas, wurde am 14.09.70 geboren.

Erste Ergebnisse meiner immunchemischen Untersuchungen an Carboxylesterasen, die ich in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. K. Krisch im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. HJ. Staudinger) durchführte, sind 1968 in der Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie erschienen. Weitere Untersuchungen machte ich in Kiel bei Herrn Prof. Dr. K. Krisch im dortigen Institut für Physiologische Chemie und Physikochemie.

